

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"**

*Tesi di Dottorato di Ricerca in  
Scienze dell'Alimentazione e della Nutrizione  
XIX ciclo*

**“Variazioni del bilancio energetico e della bioenergetica  
mitocondriale del muscolo scheletrico in seguito a  
restrizione calorica e rialimentazione nel ratto”**

*Coordinatore*  
Ch.mo Prof.  
CLAUDIO FALCONI

*Docente Tutore*  
Ch.mo Prof.  
ANTONIO BARLETTA

*Candidata*  
Dott.ssa  
ELVIRA D'ANDREA

## **INDICE**

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
Dalle fluttuazioni di peso ai disturbi metabolici: la rallentata termogenesi durante un rapido accumulo di grasso	<b>2</b>
Studi storici sulle fluttuazioni di peso	<b>3</b>
Stato nutrizionale ed efficienza metabolica	<b>8</b>
La termogenesi adattativa durante il recupero di grasso	<b>14</b>
Significato biologico del duplice sistema di controllo della termogenesi adattativa	<b>19</b>
Fisiopatologia del recupero di peso	<b>21</b>
Respirazione ed efficienza mitocondriale	<b>26</b>
La conduttanza protonica mitocondriale	<b>34</b>
I mitocondri sono una permanente fonte delle specie reattive dell'ossigeno	<b>47</b>
Danni causati dai radicali liberi a livello mitocondriale	<b>49</b>
Sistemi di difesa dai radicali liberi	<b>53</b>
Popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico: mitocondri subsarcolemmatici ed intermiofibrillari	<b>55</b>
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>59</b>
<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>67</b>
Animali e disegno sperimentale	<b>68</b>
Bilancio energetico	<b>69</b>
Misura della composizione corporea	<b>72</b>
Preparazione dei mitocondri subsarcolemmatici e intermiofibrillari dal muscolo scheletrico	<b>73</b>
Dosaggio proteico	<b>76</b>

Misura dell'attività respiratoria sui mitocondri isolati	<b>76</b>
Misura del potenziale di membrana sui mitocondri isolati	<b>78</b>
Misura della conduttanza protonica basale	<b>80</b>
Misura della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi	<b>82</b>
Misura del contenuto di UCP3 nei mitocondri isolati	<b>83</b>
Determinazione della massa proteica mitocondriale	<b>84</b>
Determinazione dell'attività dell'aconitasi mitocondriale	<b>86</b>
Determinazione dell'attività della superossido dismutasi	<b>89</b>
Determinazione dei livelli plasmatici di NEFA, glucosio e insulina	<b>91</b>
Analisi statistica	<b>92</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>93</b>
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>123</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>134</b>
Bibliografia consultata	<b>135</b>
Bibliografia citata	<b>138</b>

# **INTRODUZIONE**

**Dalle fluttuazioni di peso ai disturbi metabolici: la rallentata termogenesi durante un rapido accumulo di grasso.**

Una grande parte della popolazione umana è predisposta a grandi fluttuazioni di peso e quindi ad un accelerato recupero di grasso. Tale fenomeno riguarda:

- un neonato su quattro che ha un ritardo della crescita nei paesi sviluppati;
- milioni di bambini rachitici che possono mostrare una ripresa della crescita in paesi sottosviluppati in seguito ad una rapida variazione nutrizionale ed esposti a cibi grassi e raffinati spesso poveri di proteine di qualità e micronutrienti essenziali;
- molti degli 800 milioni di individui classificati da agenzie internazionali (WHO e FAO) come cronicamente malnutriti a causa di povertà, guerra e disastri naturali;
- il 25-50% di pazienti ospedalizzati nei paesi sviluppati che soffre di malnutrizione cronica e che necessita di riprendere peso dopo disturbi come cancro, infezioni, traumi post-operatori, ustioni e anoressia nervosa;

- le decine di milioni di persone affette dalla sindrome “Yo-Yo” nel mondo che continuamente riacquistano peso a causa di falliti tentativi di dimagrire.

### **Studi storici sulle fluttuazioni di peso**

È ben noto che i disturbi cardiovascolari sono la più comune complicanza dell'eccesso di grasso corporeo. Si stima che circa il 50% degli obesi siano ipertesi ed affetti da diabete di tipo 2, cosa che li predispone maggiormente a disturbi cardiovascolari [Kopelman PG 1984]. Mentre è stato dimostrato che una diminuzione dell'introito calorico così come una perdita di peso migliorano la sensibilità all'insulina e abbassano la pressione sanguigna, la prognosi di un trattamento a lungo termine è negativa, in quanto nella grande maggioranza dei pazienti, la fase di perdita di peso è seguita da un ritorno allo stato obeso, associato a disturbi metabolici e alti rischi cardiovascolari. Inoltre, molti dati suggeriscono che il recupero di peso è già di per sé un fattore di rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari. Infatti:

1. L'analisi di molti dati epidemiologici [Hamm P et al 1989; Lee IM et al 1992], ha rivelato una più alta morbosità ed una maggiore mortalità cardiovascolare in uomini e donne che precedentemente

avevano subito marcate fluttuazioni del peso corporeo. Queste associazioni risultano essere indipendenti dall'eccesso di peso e dal suo andamento nel tempo, e sono, quindi, clinicamente rilevanti non solo per le persone obese che non riescono a mantenere la perdita di peso, ma anche per i non obesi che variano il proprio peso a causa di disturbi cronici, come alcolismo o problemi gastrointestinali. Infatti, i più alti rischi di malattie cardiovascolari, dovuti alle grandi fluttuazioni di peso, sono stati evidenziati in campioni omogenei di persone, più che nei soli obesi. È stato riscontrato, in questo tipo di ricerche, che basta anche un singolo ciclo di perdita e recupero del peso corporeo in età giovanile, per rischiare disturbi e mortalità conseguenti a problemi coronarici [Lissner L et al 1989].

2. L'importanza del recupero del peso nei fenomeni che associano la fluttuazione del peso e successivi fattori di rischio cardiovascolari può essere evidenziata dal fenomeno dell'"*ipertensione da rialimentazione*". Episodi di tale ipertensione furono osservati in prigionieri di guerra britannici malnutriti durante il periodo di ripresa dopo il semidigiuno [Stapleton T 1946]. È stato inoltre riportato in letteratura che detenuti spagnoli in Francia sviluppavano un'improvvisa moderata ipertensione in

concomitanza con l'inizio del trattamento di recupero dal semidigiuno [Brozec J et al 1948]. Particolarmente impressionanti sono le descrizioni di un'epidemia di ipertensione e problemi cardiovascolari sorta dopo due anni dalla fine dell'assedio di Leningrado nel 1943. L'incidenza di questi disturbi aumentò marcatamente in tutti i gruppi, e non a causa delle variazioni nell'età o nella distribuzione sessuale della popolazione cittadina in tempo di guerra. Più recentemente è stato riportato lo sviluppo di ipertensione in alcuni pazienti ricaduti nell'obesità in seguito ad un periodo di terapia dimagrante. Di particolare interesse sono i risultati di studi longitudinali riguardanti interventi di emergenza su pazienti ipertesi ed obesi [Sjöström CD 2001]. In questi pazienti, nonostante sia documentato che la perdita di peso a 2-4 anni dall'intervento abbia effetti benefici sulla pressione ematica, si è notato che, dopo circa 8 anni dall'intervento, un modesto recupero di peso (meno del 25%) era accompagnato da un completo ritorno della pressione ematica ai livelli di ipertensione presenti prima dell'intervento.

3. Forse il più importante anello di congiunzione tra il recupero del peso ed i rischi cardiovascolari emerge da studi longitudinali estesi attraverso un'intera generazione in varie parti del mondo.



Alcuni dati indicano che neonati ipoponderali, bambini ed adolescenti rachitici, che in seguito riprendono a crescere, sono molto più suscettibili ad obesità centrale, problemi di tolleranza al glucosio, diabete, ipertensione e disturbi cardiovascolari in età più avanzata [Eriksson JG et al 1999]. Per esempio, dati provenienti dall'Olanda e riguardanti un gruppo di adulti esposto alla carestia alla fine o a metà della gestazione, mostrano una maggiore prevalenza di ridotta tolleranza al glucosio, ipercolesterolemia, ipertensione e obesità. In Finlandia, bambini magri alla nascita diventati obesi durante l'adolescenza, hanno un rischio di mortalità 5 volte più alto rispetto ad individui con un alto indice di massa corporea (BMI) alla nascita e magri durante l'adolescenza, sottolineando così l'importanza delle dimensioni corporee come uno dei maggiori effetti trovati nell'epidemiologia cardiovascolare. Ulteriori conferme all'idea che la ripresa della crescita, sebbene porti benefici a breve termine, può dare problemi a lungo termine, si possono trovare negli studi condotti in paesi sottoposti a transizioni nutrizionali. In Sud-Africa, Brasile, Russia e Cina è stato osservato che i bambini rachitici hanno rischi dalle due alle otto volte maggiori di essere, da adulti, in sovrappeso e/o hanno una maggiore incidenza di disturbi

cardiovascolari e metabolici [Popkin BM et al 1996]. In Guatemala, è stato trovato che i bambini rachitici sono particolarmente inclini a diventare grassi da adulti [Schroeder DG et al 1999]. C'è una crescente evidenza che questi soggetti “rachitici-obesi”, indipendentemente dal loro peso alla nascita, ma che nell'adolescenza o nell'infanzia sono diventati rachitici e che poi hanno ripreso peso, sono sottoposti ad altissimi rischi di sindrome metabolica [Victora CG et al 2001].

Considerando tutti questi studi retrospettivi e prospettivi ci si domanda perché la fase di ripresa del peso sembri, a priori, essere un periodo che rende gli individui particolarmente soggetti allo sviluppo di disturbi cardiovascolari. Le ipotesi più recenti sono incentrate sul fatto che la malnutrizione, in particolare quando avviene durante periodi critici della crescita e dello sviluppo, può portare ad alterazioni nella struttura e nella funzione di alcuni tessuti e sistemi corporei. Si pensa che tale programmazione [Jackson AA 2000] indotta dalla malnutrizione, sebbene utile durante un periodo di limitato apporto di nutrienti, contribuisca all'aumento dei rischi di disturbi quando l'alimentazione migliora più tardi nella vita. Mentre il meccanismo che controlla tali predisposizioni rimane sconosciuto, è noto che il denominatore comune di tutte le grandi fluttuazioni del peso è l'altissima velocità di accumulo

del grasso corporeo, sproporzionata rispetto a quella di deposito della massa magra; viene sottolineata, così, un'associazione potenzialmente importantissima tra i processi che portano ad accelerare l'accumulo di grasso ed i rischi cardiovascolari.

### **Stato nutrizionale ed efficienza metabolica**

Il metabolismo è un processo finemente coordinato in cui le reazioni che avvengono in ogni determinato momento sono adeguate alle necessità cellulari. Le funzioni essenziali delle cellule e degli organi si basano infatti su reazioni chimiche che estraggono energia dalle biomolecole di nutrienti, come carboidrati, lipidi e proteine. L'energia estratta da questi substrati serve a soddisfare il fabbisogno energetico degli organi.

In un adulto normale il cervello contribuisce per circa il 20% alla spesa energetica a riposo, il muscolo scheletrico il 18-22%, i muscoli addominali circa il 25%, il cuore circa l'11% ed infine il fegato circa il 20%. Il fabbisogno energetico giornaliero, nei diversi tessuti, può variare in base alle esigenze e l'attività di un organismo. Per esempio, con l'esercizio fisico la richiesta energetica del muscolo scheletrico aumenta, mentre durante un pasto, gli organi addominali richiedono più energia per la digestione e l'assorbimento.

La presenza o l'assenza di nutrienti in circolo mobilita in modo diverso le fonti interne di energia. L'organismo è quindi in grado di adattarsi a diverse condizioni metaboliche.

Il periodo di tempo successivo al pasto, quando i prodotti della digestione vengono usati o accumulati, viene definito condizione di sazietà o postprandiale. Quando tutti i nutrienti di un pasto non sono più presenti in circolo, l'organismo entra in uno stato postassorbitivo; in tale condizione la concentrazione plasmatica di glucosio comincia a scendere. Nello stato di digiuno, la regolazione delle vie biochimiche del metabolismo è principalmente sotto il controllo del sistema endocrino e dipende in larga parte dal rapporto insulina e glucagone, ormoni secreti dal pancreas endocrino. Questi ormoni agiscono in antagonismo per mantenere le concentrazioni plasmatiche del glucosio a livelli accettabili, e per assicurare un adeguato apporto energetico al sistema nervoso.

In una condizione di sazietà, quando l'organismo assorbe nutrienti, l'insulina è dominante e svolge un'azione anabolica. L'effetto più evidente è quello di abbassare il glucosio ematico con conseguenze di un aumentato passaggio di glucosio nel muscolo e nel tessuto adiposo mediante diffusione facilitata. L'insulina stimola anche la formazione di glicogeno e la glicolisi nelle sue cellule bersaglio e diminuisce il rilascio di glucosio da parte del fegato. Nel fegato e nel tessuto adiposo l'insulina stimola anche la

sintesi degli acidi grassi e ne promuove l'accumulo come triacilgliceroli. Nel tessuto adiposo inoltre promuove l'assunzione di lipoproteine nelle cellule e inibisce la lipolisi. Infine l'insulina stimola l'accumulo di proteine nella maggior parte dei tessuti del corpo, determinando così un bilancio azotato positivo.

In condizioni di digiuno, invece, il glucagone è dominante e svolge un'azione catabolica agendo principalmente sul fegato, dove stimola la glicogenolisi e la gluconeogenesi. Inoltre, il glucagone determina un aumento dei substrati per la gluconeogenesi epatica stimolando la degradazione delle proteine e il trasporto di aminoacidi. Queste azioni combinate del glucagone hanno l'effetto di mantenere le concentrazioni ematiche di glucosio entro valori fisiologici anche durante il digiuno.

E' interessante considerare che nella condizione di digiuno o di limitato apporto di nutrienti, come per la restrizione calorica, oltre agli adattamenti di tipo biochimico, si hanno anche degli adattamenti per limitare la spesa energetica, in modo da garantire la sopravvivenza per un periodo più lungo possibile. Si assiste, infatti, alla riduzione della velocità metabolica basale (BMR) del 20% circa [Dulloo AG e Jacquet S, 1998; Iossa S et al, 1992]. Il digiuno è accompagnato da una diminuzione della velocità metabolica che è maggiore di quanto ci si potesse aspettare tenendo presente la perdita di peso e di massa magra. Questa deviazione dai valori predetti è

generalmente considerata il risultato di un processo regolatorio di energia introdotta, che aumenta l'efficienza metabolica diminuendo l'utilizzo dell'energia cellulare, sopprime la termogenesi e quindi riduce la velocità alla quale i tessuti corporei vengono sostituiti [Dulloo AG e Jacquet S, 1998].

È noto che tale soppressione della termogenesi, osservata in uno stadio relativamente precoce nel corso del digiuno, è principalmente sotto il controllo del sistema nervoso simpatico (SNS) e si ritiene sia dettata da segnali innescati direttamente in funzione del deficit di energia nutrizionale [Landsberg L et al, 1984 (a)].

Inoltre, la comune osservazione che nei periodi di rialimentazione che seguono periodi di digiuno o di restrizione calorica il grasso sia accumulato prima del tessuto magro suggerisce la possibilità che:

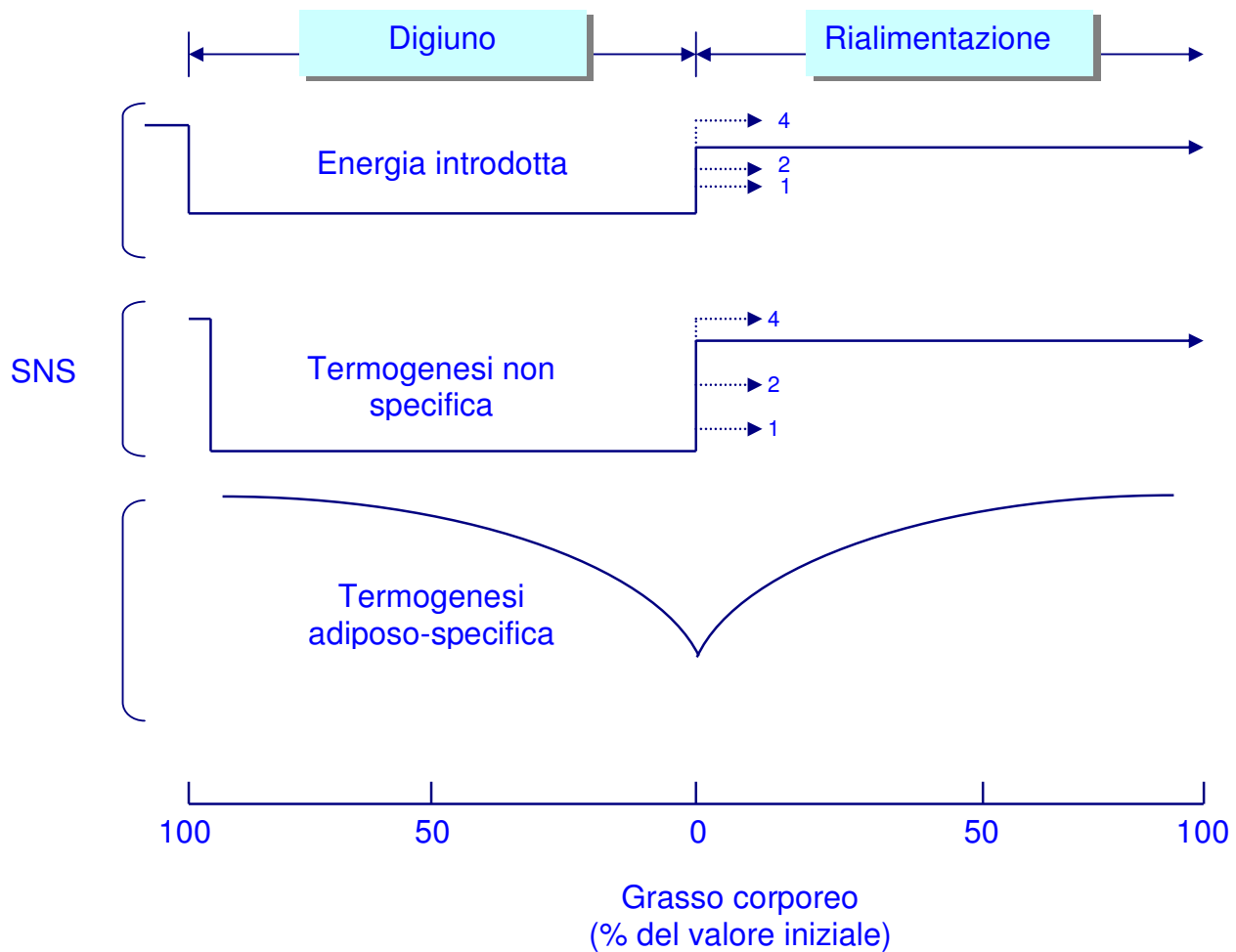
- una componente della riduzione della termogenesi durante la perdita di peso è dettata anche da segnali generati specificamente in risposta al consumo delle riserve di grasso;
- questa componente della riduzione adattativa della termogenesi, che persiste durante il recupero di peso, ha lo scopo di accelerare la ricostituzione delle riserve di grasso.

La riduzione adattativa della termogenesi in risposta al digiuno e alla rialimentazione può quindi pensarsi costituita da due distinti sistemi di

controllo, come descritto in *figura 1*. Un primo sistema di controllo, funzione diretta delle variazioni dell'apporto di energia, risponde con relativa rapidità al deficit energetico. I suoi meccanismi effettori sono soppressi precocemente durante il corso del digiuno, e con la rialimentazione vengono ristabiliti rapidamente in funzione della nuova disponibilità di energia, e in seguito possono essere ulteriormente stimolati se si verifica iperfagia durante la rialimentazione, cosa che potrebbe contribuire ad un aumento della termogenesi indotta dalla dieta (DIT) [Ashworth A, 1969]. Dal momento che l'attività di tale sistema di controllo, essenzialmente sotto il controllo del SNS, risulta essere modulato non solo dall'apporto energetico della dieta, ma anche da una varietà di altri fattori ambientali come la composizione della dieta, la mancanza di specifici nutrienti, la temperatura ambientale, stress fisiologici [Landsberg L et al, 1984 (b)], tale fenomeno è denominato “*sistema di controllo non-specifico della termogenesi*”. Al contrario, l'altro sistema di controllo ha una costante di tempo maggiore, in quanto risponde solo a segnali provenienti dalle riserve di grasso; è quindi denominato “*controllo adiposo-specifico della termogenesi*” [Dulloo AG e Jacquet J, 2001].

**Figura 1**

**La riduzione adattativa della termogenesi in risposta al digiuno e alla  
rialimentazione: i due sistemi di controllo**



I livelli 1-4 durante la rialimentazione corrispondono a differenti introiti calorici: l'energia introdotta ai livelli 1 e 2 risulta inferiore a quella precedente al digiuno, mentre quella a livello 4 è superiore



## **La termogenesi adattativa durante il recupero di grasso**

Più dirette evidenze dell'esistenza di una soppressione adiposo specifica della termogenesi, il cui ruolo è quello di accelerare specificamente il recupero di grasso corporeo, può derivare da studi del bilancio energetico in animali da laboratorio che recuperano peso dopo il semidigiuno. Se i ratti sottoposti a restrizione calorica vengono rialimentati con la stessa quantità di cibo dei controlli dello stesso peso, la velocità della deposizione delle proteine risulta essere la stessa dei controlli, mentre la velocità di deposizione dei grassi aumenta di circa 2 volte come risultato di una spesa energetica più bassa del 10-15%, durante le prime due/tre settimane di rialimentazione isoenergetica [Dulloo AG e Jacquet J, 2001]. Molti fattori che possono teoricamente contribuire a questa differenza nell'energetica tra i ratti rialimentati ed i controlli (differenza di età, attività fisica e tipo di dieta) hanno in realtà un minimo impatto sulla differenza della spesa energetica fra i due gruppi [Dulloo AG e Girardier L, 1990]. Di conseguenza, nelle condizioni di rialimentazione, la spesa energetica più bassa nei ratti rialimentati rispetto a quella dei controlli è essenzialmente un'energia risparmiata come risultato di una sostenuta soppressione della termogenesi allo scopo di riacquistare grasso.

Il fatto che, quando sia i ratti rialimentati sia i controlli vengono iso-alimentati durante l'esposizione a freddo (uno stato di elevata attivazione simpatica della termogenesi), gli animali rialimentati mostrano ancora la capacità di conservare energia per accumulare grasso [Dulloo AG et al, 1995], suggerisce che i meccanismi che controllano la soppressione adiposo-specifica della termogenesi sono chiaramente distinti dal controllo simpatico della termogenesi. In altre parole, il fatto che durante il recupero di peso la soppressa termogenesi adiposo-specifica (conservazione di energia) può coesistere con una stimolata termogenesi mediata dal simpatico (dissipazione di energia), in risposta a stimoli di freddo [Dulloo AG et al, 1995], iperfagia [Dulloo AG e Girardier L, 1993], diete povere di proteine [Dulloo AG e Girardier L, 1992], o infezioni [Arsenijevic D et al, 1997], suggerisce che questi due sistemi di controllo hanno siti effettori distinti e il controllo della termogenesi adiposo-specifico avviene in siti diversi da quelli reclutati dal SNS in risposta alla dieta e al freddo. Sulla base di studi della cinetica della velocità di turnover della norepinefrina in diversi organi e tessuti [Landsberg L e Young JB, 1978] (*tabella 1*) si può postulare che il meccanismo alla base del controllo non specifico della termogenesi opera in tessuti ed organi metabolicamente molto attivi (come il fegato, i reni, il cuore e il tessuto adiposo bruno) ed è rapidamente ristabilito in seguito ad una nuova disponibilità di cibo.

## Tabella 1

**Eterogeneità dell'attività del sistema nervoso simpatico in risposta alla  
dieta e alla temperatura ambientale nel ratto**

<b>Stimolo</b>	<b>Freddo (6°C vs 22°C)</b>	<b>Cibo (normali vs digiuno)</b>
<b>Cuore</b>	↑	↑
<b>Pancreas</b>	↑	↑
<b>Fegato</b>	0	↑
<b>Rene</b>	0	↑
<b>BAT</b>	↑	↑
<b>WAT</b>	↑	↓
<b>Muscolo scheletrico</b>	0	0

BAT: tessuto adiposo bruno.

WAT: tessuto adiposo bianco.

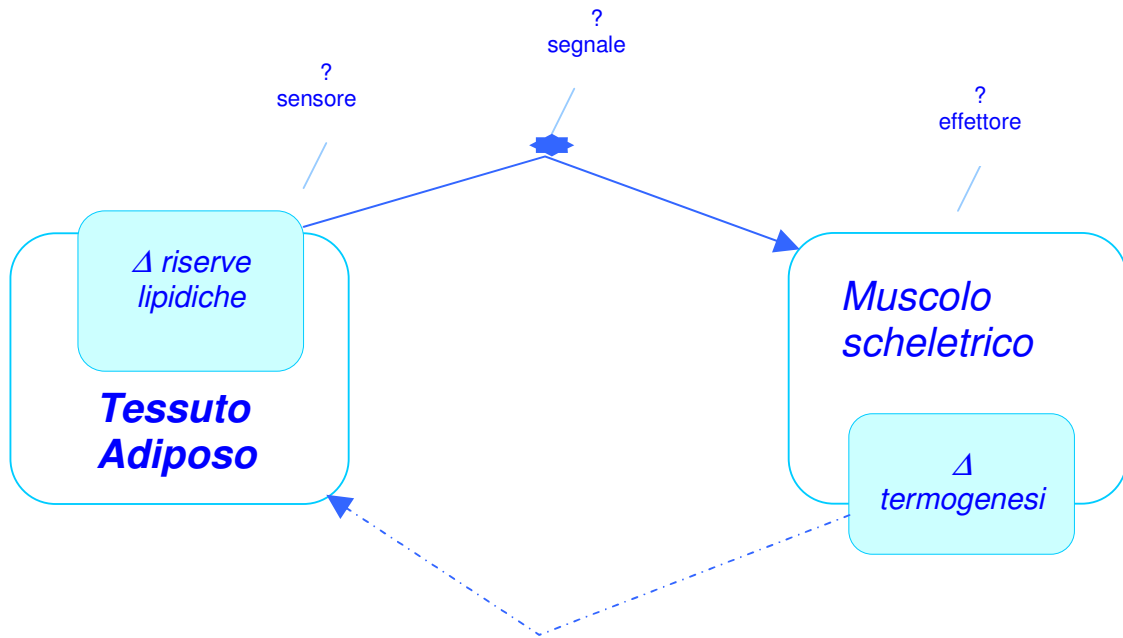
Le frecce rivolte verso l'alto o verso il basso indicano l'aumento o la diminuzione dell'attività del SNS; il simbolo zero indica che non vi sono cambiamenti significativi

Al contrario, il meccanismo alla base del controllo adiposo specifico della termogenesi opera soprattutto nel muscolo scheletrico, un tessuto già conosciuto come importante sito della soppressione della termogenesi indotta dal digiuno, come osservato da studi di circolazione regionale di sangue mediante microsfele, accoppiato con misure di consumo di ossigeno artero-venoso [Ma SWY e Foster DO, 1986]. Come descritto in *figura 2*, tale sistema potrebbe comprendere uno o più sensori dello stato di deplezione dei depositi di grasso, uno o più segnali che innescano la soppressione della termogenesi in funzione dello stato di riduzione dei depositi di grasso e un sistema effettore che media la termogenesi adattativa nel muscolo scheletrico.

Fino ad oggi, comunque, gli studi di digiuno prolungato e di rialimentazione hanno indicato che né i livelli circolanti di acidi grassi liberi (FFA) né la leptina mostrano variazioni temporali correlate con la cinetica della soppressione della termogenesi adiposo-specifica [Samec S et al, 1997]. Attenendoci alle conoscenze attuali, i sensori, i segnali e il sistema effettore del controllo della termogenesi adiposo-specifica rimangono sconosciuti.

**Figura 2**

**Controllo adiposo-specifico della termogenesi: segnali tra organi**



## **Significato biologico del duplice sistema di controllo della termogenesi adattativa**

Durante il digiuno, il controllo della ripartizione determina la relativa proporzione di proteine e grassi da mobilizzare come carburante per il corpo, e l'energia conservata dovuta ad una soppressione della termogenesi è diretta a ridurre lo sbilancio energetico, con il netto risultato che c'è una diminuzione della velocità di mobilizzazione di proteine e grassi nella stessa proporzione definita dalla ripartizione individuale dell'energia. Infatti, il fatto che in uomini con peso normale la frazione di energia derivata dalle proteine rimanga la stessa durante il corso di un digiuno prolungato [Henry CJK et al, 1988] implica che il sistema di controllo della soppressione della termogenesi non è diretto a risparmiare proteine né specificatamente grassi, ma a risparmiare sia proteine sia grassi. Durante il digiuno, inoltre, il ruolo funzionale di entrambi i sistemi di controllo della soppressa termogenesi è di ridurre la velocità totale di utilizzo dei substrati energetici.

Durante la rialimentazione, il controllo della ripartizione opera in modo tale che proteine e lipidi siano depositati nella stessa relativa proporzione determinata dalle caratteristiche di ripartizione individuali che c'erano durante il digiuno, e fa sì che l'aumentata disponibilità di cibo porti alla rapida eliminazione della soppressione della termogenesi non specifica

(mediata dal SNS). Al contrario, la soppressione della termogenesi dovuta al controllo adiposo specifico è eliminata più lentamente in funzione del recupero di grasso, in modo tale che l'energia che continua ad essere risparmiata è diretta specificamente a ricostituire i depositi di grasso.

Un tale fenomeno adattativo che accelera la ricostituzione dei depositi di grasso piuttosto che convogliare l'energia risparmiata verso un incremento compensatorio della sintesi corporea di proteine (un processo energeticamente costoso), potrebbe avere un significato di sopravvivenza nello stile di vita ancestrale caratterizzato da un'alternanza tra carestie e periodi di elevata disponibilità di cibo. In virtù del fatto che il grasso corporeo ha una maggiore densità energetica e un più basso costo di sintesi e di mantenimento rispetto alle proteine, esso potrebbe consentire all'organismo una più alta capacità di ricostituire rapidamente una riserva energetica efficiente e quindi di ottimizzare la sua capacità di sopravvivenza di fronte ad un'eventuale carenza di cibo. Ugualmente importante per la sopravvivenza dei mammiferi durante il recupero del peso è la necessità di mantenere la capacità di aumentare la produzione di calore (la termogenesi) in risposta a diversi stress ambientali quali:

- aumentati bisogni termoregolatori durante il recupero di peso in ambienti freddi;
- generazione di febbre durante l'esposizione a infezioni;

- aumentata produzione di calore come adattamento a diete carenti.

Questi sistemi di controllo della termogenesi differentemente regolati potrebbero essersi affermati durante il corso dell'evoluzione dei mammiferi come un duplice processo adattativo in grado di soddisfare le necessità della conservazione di energia diretta specificamente al recupero dei grassi persino in presenza di stress ambientali, quando l'attivazione della produzione di calore mediata dal simpatico è ugualmente importante per la sopravvivenza.

### **Fisiopatologia del recupero di peso**

Il fenomeno della termogenesi soppressa durante il recupero del peso è generalmente considerato un adattamento fisiologico, che permette ai mammiferi di riacquistare il loro peso normale dopo un periodo di digiuno. Vi è però uno stretto collegamento tra tale termogenesi soppressa a diversi stati patologici, come l'obesità, il diabete e malattie cardiovascolari [Rich-Edwards JW et al, 1997; Eriksson JG et al, 1999; Schroeder DG, 1999; Cianfarani S et al, 1999; Huxley RR et al, 2000; Ong KKL et al, 2000; Roseboom TJ et al, 2001; Victora CG e Barros FC, 2001; Crescenzo R et al 2006]. La possibilità di contrarre tali malattie aumenta notevolmente nel corso di una rialimentazione isoenergetica con una dieta ad alto contenuto di grassi. Ciò sottolinea come, in risposta ai nostri moderni pasti grassi, l'attuazione di una reazione fisiologica adattativa in risposta ad un calo dei



depositi di grasso è spinta oltre i limiti per i quali era stata progettata, per consentire la sopravvivenza in condizioni di diete povere di grasso. In pratica, l'aumento del contenuto lipidico della dieta ha compromesso un complesso sistema omeostatico. Uno schema del meccanismo con il quale l'esasperata soppressione adiposo-specifica della termogenesi durante il recupero di peso può essere implicata nella transizione da uno stato fisiologico normale ad uno stato fisiopatologico è presentato in *figura 3*.

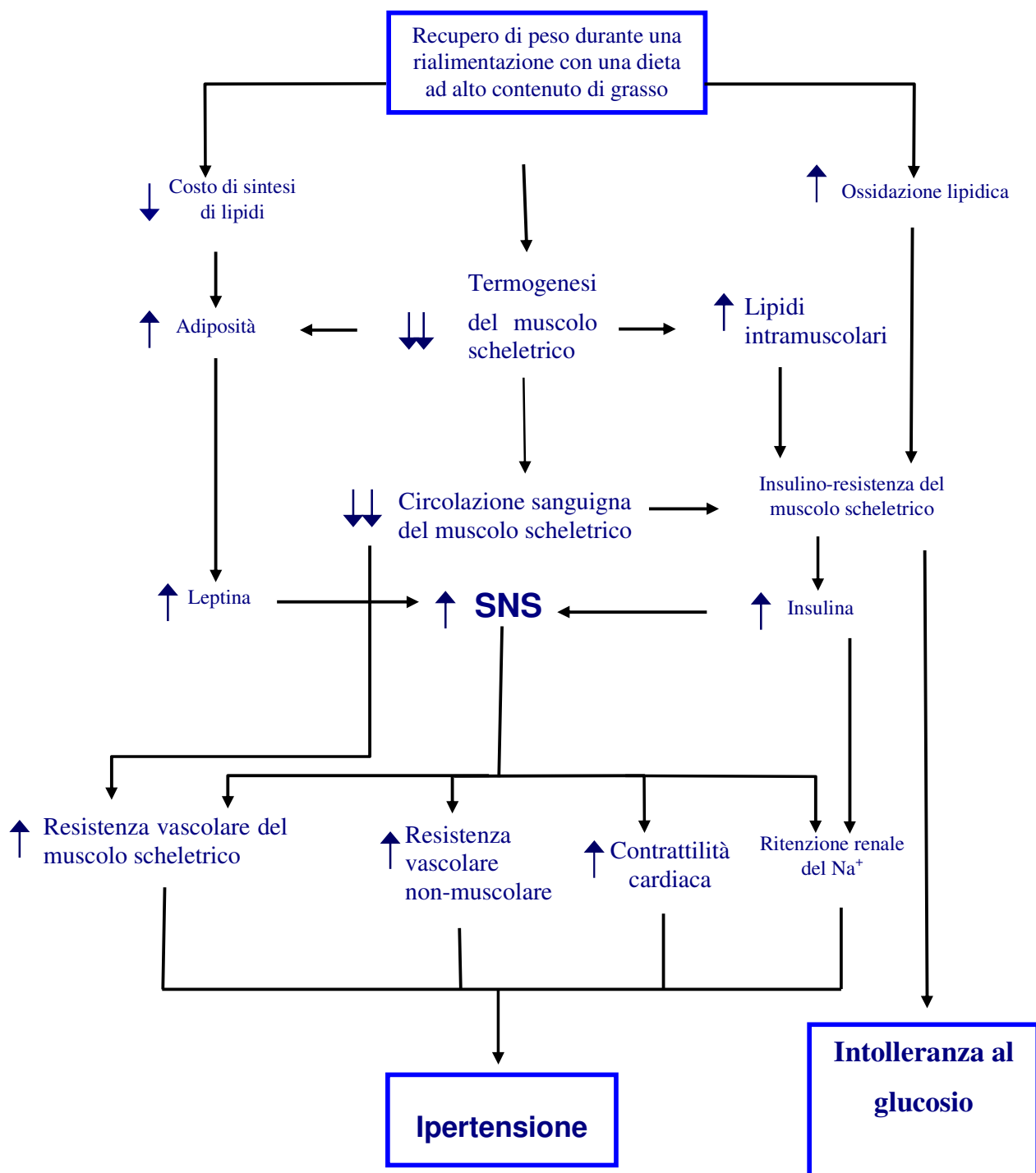
1. Lo schema è centrato sul fatto che la soppressione della termogenesi adiposo-specifica ha luogo soprattutto nel muscolo scheletrico.
2. Durante una rialimentazione isoenergetica con una dieta a basso contenuto di grassi la termogenesi soppressa del muscolo scheletrico si traduce in una diminuita attività metabolica e quindi in una minore circolazione di sangue in questo tessuto, ma non a livelli tali da portare disparità nel metabolismo dei substrati né nell'omeostasi della pressione ematica.
3. Durante la rialimentazione isoenergetica con una dieta ad alto contenuto di grassi, invece, l'esagerata soppressione della termogenesi può portare ad una cattiva omeostasi del glucosio e a rischi di ipertensione. Innanzitutto, un'esagerata riduzione della circolazione sanguigna, un eccesso di acidi grassi liberi circolanti e un accumulo di grasso nel muscolo scheletrico (con conseguente lipotossicità) sono tutti fattori

implicati nello sviluppo della resistenza all'insulina del muscolo scheletrico, che l'organismo prova a compensare attraverso un incremento della produzione di insulina. Inoltre, una iper-soppressione della termogenesi del muscolo scheletrico insieme con il basso costo di sintesi di grasso durante la rialimentazione con una dieta ad alto contenuto di grassi, portano ad un eccesso di adiposità e probabilmente ad un incremento della produzione di leptina. Le risultanti condizioni di iper-insulinemia ed iper-leptinemia rappresentano condizioni di stimolazione dell'attività del SNS e possono quindi portare ad un aumento della resistenza vascolare (inclusa una vasocostrizione muscolare), della contrattilità cardiaca e della ritenzione di sodio, che possono esasperare lo stato di resistenza all'insulina e i rischi di ipertensione. Inoltre, mentre l'esagerata riduzione della circolazione sanguigna nel muscolo scheletrico può contribuire direttamente ad aumentare la resistenza vascolare in questo tessuto, un aumento di insulina può anche esercitare effetti diretti sui tubuli renali e quindi contribuire alla ritenzione di sodio, con conseguenze sulla regolazione della pressione sanguigna [Landsberg L, 1986]. In questo contesto, un'esasperazione della soppressione adiposo-specifica della termogenesi indotta da una elevata percentuale di grassi nella dieta può quindi essere considerato come evento primario che conduce

all'eccesso di adiposità, alla resistenza all'insulina ed eventualmente all'ipertensione.

**Figura 3**

**Ruolo centrale della soppressione della termogenesi del muscolo scheletrico nella patogenesi di ipertensione ed intolleranza al glucosio**



## **Respirazione ed efficienza mitocondriale**

Un organismo particolarmente efficiente da un punto di vista metabolico è in grado certamente di sopravvivere più a lungo nei periodi di carestia, ma è anche quello che accumula facilmente tessuto adiposo in un periodo di grande abbondanza di cibo. L'efficienza metabolica può essere definita come una misura dell'entità con cui l'organismo ottiene energia, sotto forma di composti ad elevato contenuto energetico (ATP), dai nutrienti che introduce con l'alimentazione. Il grado di efficienza metabolica potrebbe, quindi, giustificare la naturale tendenza di alcuni organismi di accumulare grasso più facilmente di altri. Questi organismi sono anche quelli che più facilmente sopravvivono in condizioni di prolungato digiuno.

I meccanismi che concorrono alla regolazione dell'efficienza metabolica, in genere, sono poco conosciuti. I cambiamenti della spesa energetica a livello dell'organismo in "toto" riflettono paralleli cambiamenti a livello di quegli organi e tessuti, che maggiormente contribuiscono alla velocità metabolica corporea. A livello cellulare, variazioni dell'efficienza energetica mitocondriale nei vari tessuti possono, senz'altro, contribuire alle variazioni dell'efficienza metabolica corporea. Quindi, in condizioni particolari in cui è diminuita la spesa energetica, quali il digiuno, la restrizione calorica e la rialimentazione dopo un periodo di restrizione calorica, la comprensione dei meccanismi di regolazione dell'efficienza

mitocondriale può essere di primaria importanza per capire sia la modulazione dell'efficienza metabolica dell'intero organismo, sia particolari fenomeni indotti da tali stimoli fisiologici nei vari organi.

I mitocondri, presenti in tutte le cellule eucariotiche, sono organelli circondati da membrane che convertono l'energia in forme utili a promuovere le reazioni cellulari. Con la respirazione mitocondriale, la cellula opera l'ossidazione completa dei substrati organici a spese dell'ossigeno fino ad anidride carbonica ed acqua, ricavandone energia. La respirazione in senso stretto consiste nel ciclo dell'acido citrico o ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA), le cui reazioni avvengono nella matrice mitocondriale, e nel trasporto degli elettroni lungo la catena respiratoria, associata alla membrana interna del mitocondrio. La membrana interna è altamente specializzata. Essa contiene un'alta proporzione del fosfolipide «doppio» cardiolipina, che è costituito da quattro acidi grassi e può aiutare a rendere la membrana particolarmente impermeabile agli ioni. Essa contiene anche una varietà di proteine di trasporto che la rendono selettivamente permeabile a quelle piccole molecole che sono metabolizzate o richieste dai molti enzimi mitocondriali concentrati nello spazio della matrice.

Nel processo respiratorio mitocondriale viene utilizzato principalmente piruvato che si forma nella glicolisi, ma possono essere utilizzati molti altri

acidi organici e in particolare il malato, chetoacidi derivanti dalla deaminazione degli amminoacidi, gli amminoacidi derivanti dalla idrolisi delle proteine o gli acidi grassi derivanti dall'idrolisi dei lipidi. Il piruvato e gli acidi grassi sono trasportati selettivamente dal citosol nella matrice mitocondriale, dove sono demoliti nei gruppi acetile a due atomi di carbonio dell'acetil-CoA; il gruppo acetile entra poi nel ciclo dell'acido citrico per essere ossidato ulteriormente. I prodotti finali principali di questa ossidazione sono  $\text{CO}_2$ , che è rilasciata dalla cellula come prodotto di rifiuto, nicotinamide adenin dinucleotide ridotto o NADH, che è la fonte principale di elettroni per il trasporto lungo la catena respiratoria. Poiché tale trasporto di elettroni avviene secondo la scala di potenziale redox e, dunque, secondo un gradiente energetico favorevole, ad esso possono essere accoppiate le reazioni di sintesi di adenosinatrifosfato o ATP (*fosforilazione ossidativa*).

Gli enzimi della catena respiratoria sono immersi nella membrana mitocondriale interna, che è in genere molto convoluta, e forma una serie di ripiegamenti, noti come creste, nello spazio della matrice.

Il significato metabolico del ciclo dell'acido citrico è l'estrazione di elettroni ad alta energia tramite l'ossidazione del gruppo acetile a  $\text{CO}_2$ . Questi elettroni sono trasferiti a due coenzimi NAD e FAD (flavin adenin dinucleotide) o accettori redox che sono ridotti a NADH e  $\text{FADH}_2$  prodotto

dalla succinico deidrogenasi. Ciò consente alla cellula di recuperare sotto forma di potenziale redox buona parte dell'energia già contenuta nelle molecole dei substrati organici. Attraverso la catena di trasporto degli elettroni viene rimossa una coppia di elettroni dal NADH o dal  $\text{FADH}_2$  riducenti ad alta energia, per essere avviata lungo una sequenza di componenti-trasportatori, i cui valori di potenziale redox diventano progressivamente più positivi fino all'ossigeno che, accettando gli elettroni, si riduce ad acqua. Quindi la membrana interna partecipa attivamente al processo di trasduzione dell'energia con la sua permeabilità selettiva agli ioni, permettendo la creazione di un gradiente di potenziale elettrochimico dei protoni fra la matrice mitocondriale e lo spazio intermembrana.

Secondo l'ipotesi chemiosmotica, durante il trasporto degli elettroni ad alta energia dagli idrogeni del NADH e del  $\text{FADH}_2$  lungo la catena respiratoria fino alla membrana mitocondriale interna, l'energia rilasciata nel passaggio da un trasportatore al successivo è usata per pompare protoni ( $\text{H}^+$ ) attraverso la membrana interna dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana (*figura 4*). Ciò crea un gradiente elettrochimico protonico attraverso la membrana mitocondriale interna e il flusso di ritorno di  $\text{H}^+$  lungo questo gradiente viene a sua volta usato per attivare l'enzima legato alla membrana, ATP sintetasi, che catalizza la conversione di  $\text{ADP} + \text{P}_i$



(adenosina difosfato e fosfato inorganico) ad ATP, completando il processo della fosforilazione ossidativa.

L'ATP sintetasi si comporterebbe, dunque, come una permeasi protonica che tende a riequilibrare il gradiente elettrochimico dei protoni fra i due lati della membrana, traducendo così l'energia del gradiente in energia conformazionale e, quindi, in energia di legame chimico dell'ATP. L'ATP prodotto dalla fosforilazione all'interno dei mitocondri esce dal mitocondrio grazie all'enzima traslocasi dei nucleotidi adeninici (ANT) inserito nella membrana mitocondriale interna, che catalizza lo scambio con un ADP citosolico entrante nel mitocondrio [Kim JM et al, 1988]. Il trasferimento degli  $H^+$ , attraverso la membrana interna, dallo spazio della matrice allo spazio intermembrana ha come conseguenza la formazione di due tipi di gradienti:

1. un gradiente di pH ( $\Delta pH$ ) attraverso la membrana mitocondriale interna, con il pH della matrice più alto (basico) di quello dello spazio intermembrana;
2. un gradiente di voltaggio ( $\Delta V$ ) (o potenziale di membrana,  $\Delta \psi$ ) derivante dal flusso netto di ioni positivi verso l'esterno, per cui la membrana interna risulterà carica positivamente all'esterno e negativamente all'interno.

Queste due grandezze ( $\Delta pH$  e  $\Delta\psi$ ) determinano la forza motrice dei protoni, il cosiddetto *gradiente protonico elettrochimico* ( $\Delta p$ ). Tale gradiente elettrochimico di  $H^+$  è quindi la forza spingente per la sintesi di ATP.

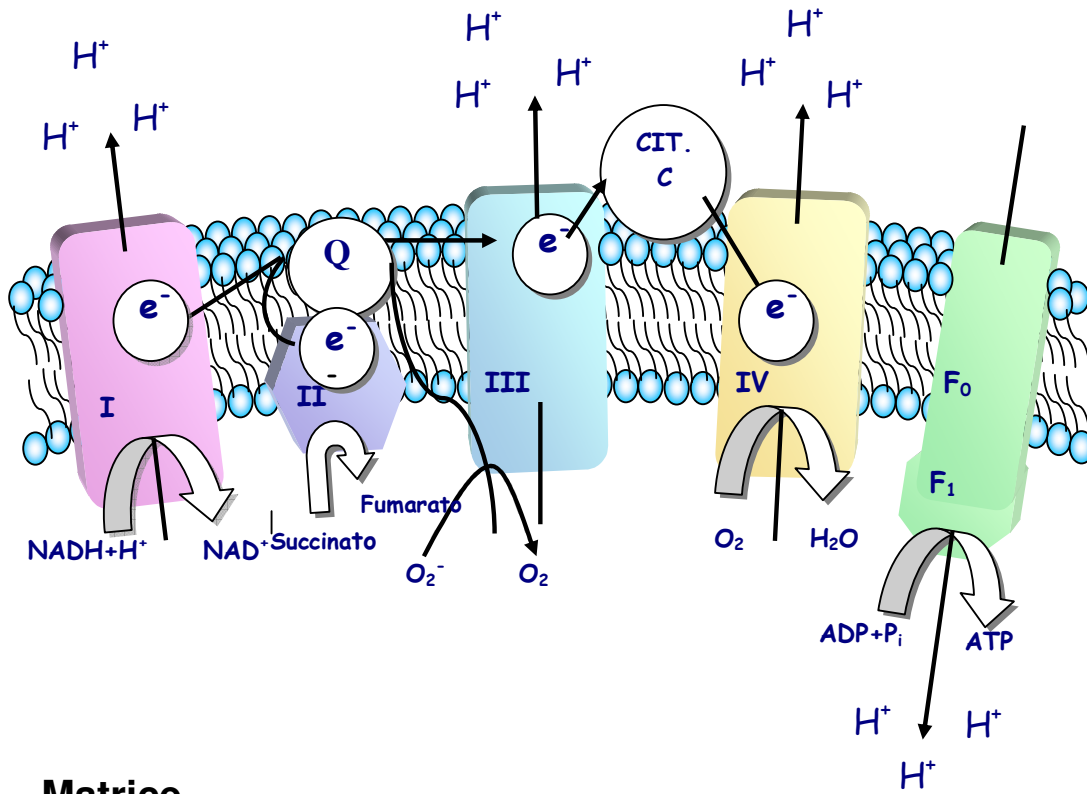
Nel processo di fosforilazione della catena respiratoria, l'ADP e il fosfato sono dei reagenti necessari per il trasporto degli elettroni dal NADH all'ossigeno. Infatti, il trasporto degli elettroni procede alla massima velocità nei mitocondri isolati soltanto quando fosfato e ADP sono presenti nel mezzo in cui sono sospesi in quantità saturanti. In assenza di ADP, la velocità della respirazione è molto bassa e non avviene alcuna fosforilazione poiché non vi è accettore per il fosfato, e naturalmente, non vi è sintesi di ATP. Questa condizione nota come *Stato 4* della respirazione, è lo stato di riposo della respirazione. Se ad un sistema isolato di mitocondri allo Stato 4 si aggiunge una quantità saturante di ADP, il consumo di ossigeno aumenta bruscamente fino ad un massimo e contemporaneamente l'ADP aggiunto viene fosforilato ad ATP. Questo è chiamato *Stato 3* o respirazione attiva. Quando tutto l'ADP aggiunto è stato fosforilato, la velocità di consumo dell'ossigeno ritorna allo Stato 4. Questo fenomeno, in cui la velocità di trasporto degli elettroni è controllata dalla concentrazione di ADP, è chiamato controllo da parte dell'accettore o controllo respiratorio. I mitocondri, infatti, hanno un'affinità molto elevata

per l'ADP e continuano a fosforilarlo, purchè siano presenti tutti gli altri componenti necessari, finchè la concentrazione di ADP non diventa molto bassa. Il rapporto o *indice di controllo da parte dell'accettore (RCR)* è il rapporto tra la velocità di respirazione dei mitocondri in presenza di notevoli quantità di ADP e la velocità di respirazione in assenza di ADP. Questo rapporto è normalmente molto alto; può essere di 5 o più nei mitocondri intatti e anche più alto nella cellula intatta. Tuttavia, quando i mitocondri sono danneggiati o preparati meno di recente, perdono la loro capacità di fosforilare ADP e il rapporto scende a 1. In questi mitocondri danneggiati il trasporto degli elettroni avviene alla massima velocità in assenza di ADP. Il rapporto di controllo da parte dell'accettore è un utile misura dell'integrità dei mitocondri isolati: più alto è il rapporto più integri sono i mitocondri.

**Figura 4**

**Catena respiratoria mitocondriale**

**Spazio  
intermembrana**



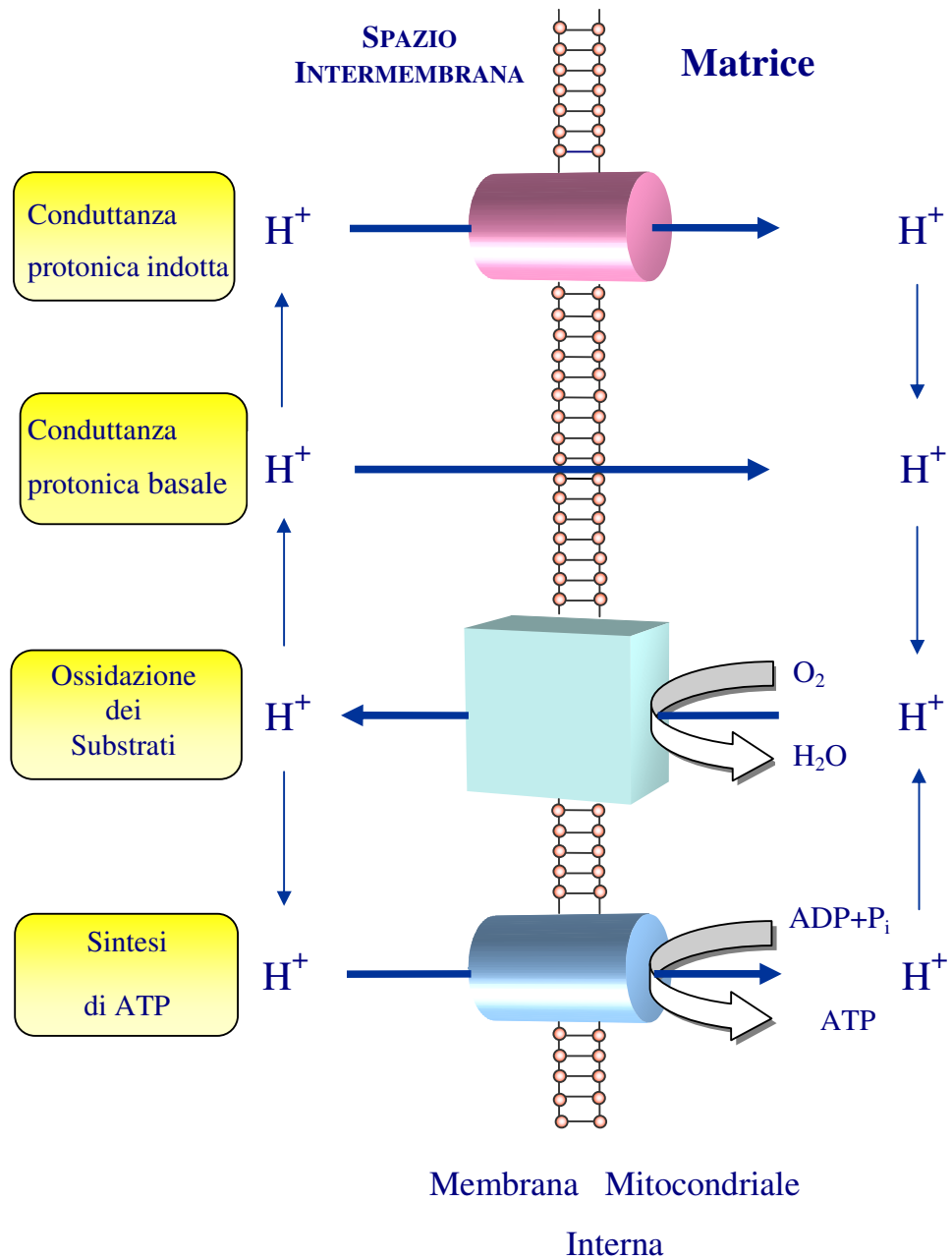
## La conduttanza protonica mitocondriale

L'efficienza del sistema mitocondriale è influenzata dalle caratteristiche di impermeabilità agli  $H^+$  della membrana mitocondriale interna. Tuttavia, nei mitocondri di tutti i tessuti finora studiati, l'accoppiamento tra l'ossidazione dei substrati e la sintesi dell'ATP non è efficiente al 100% poiché la membrana interna dei mitocondri presenta una perdita protonica passiva chiamata *conduttanza protonica basale* [Nicholls DG, 1974] (*figura 5*).

La *figura 5* mostra i circuiti protonici chemiosmotici lungo la membrana interna dei mitocondri isolati. Quindi, schematizzando, l'ossidazione del substrato consiste nel trasporto del substrato, nel suo metabolismo e nella catena di trasporto degli elettroni. Contemporaneamente a questa si ha un passaggio di protoni dalla matrice allo spazio intermembrana che dà origine ad un gradiente elettrochimico protonico. Nel circuito in basso, il ritorno dei protoni verso la matrice è accoppiato alla produzione di adenosina trifosfato (ATP) tramite l'ATP sintetasi. I circuiti in alto mostrano il flusso protonico disaccoppiante attraverso la via della conduttanza basale o attraverso la via della conduttanza inducibile (rappresentata da una proteina, come potrebbe essere una proteina disaccoppiante UCP).

**Figura 5**

**Circuiti protonici chemiosmotici lungo la membrana interna di  
mitocondri isolati**



La conduttanza protonica basale non è un artefatto dell'isolamento dei mitocondri, poiché è stato dimostrato che essa è presente anche nei mitocondri di cellule e di organi intatti, come il fegato, i timociti, i linfociti, il muscolo scheletrico ed il cuore [Rolfe DFS e Brand MD, 1996; Challoner DR, 1968].

Diversi studi hanno dimostrato che il contributo della conduttanza protonica basale al consumo di ossigeno può essere molto elevato, con percentuali che oscillano dal 20% al 50%, in tessuti quali il fegato ed il muscolo. In particolare tale contributo è del 20% negli epatociti attivi e del 25% negli epatociti a riposo [Rolfe DFS e Brand MD, 1996; Brand MD et al, 1994]. Nel muscolo di ratto le percentuali sono più elevate: il 35% nel muscolo in contrazione e il 50% nel muscolo a riposo. Nel cuore intatto, in contrazione, è di circa il 12% [Brand MD et al, 1994]. E' stato calcolato, inoltre, che la conduttanza protonica basale utilizza il 20-25% dell'ossigeno totale, necessario per il mantenimento della velocità metabolica basale del ratto [Rolfe DFS e Brand MD, 1996].

La conduttanza protonica basale mitocondriale è presente non solo negli animali omeotermi, ma anche negli eterotermi e nelle piante indicando che tale proprietà è conservata non solo nei differenti tessuti di uno stesso animale o pianta, ma anche tra specie differenti [Laloi M et al, 1997; Stuart JA et al, 1999].

Gli acidi grassi sono dei disaccoppianti naturali della fosforilazione ossidativa nei mitocondri. Nelle cellule intatte e nei tessuti, essi rappresentano un eccellente substrato respiratorio poiché forniscono elettroni alla catena respiratoria. Questa funzione maschera il loro potenziale effetto disaccoppiante che diventa evidente solo in speciali condizioni fisiologiche (digiuno, diete ad alto contenuto di grassi, esercizio eccessivo) o patologiche (diabete) caratterizzate da un inusuale accumulo di acidi grassi [Soboll S et al, 1984]. Il disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi è stato denominato *conduttanza protonica indotta* (figura 5).

Il coinvolgimento degli acidi grassi nell'indurre una variazione dell'accoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale è nota sin dall'inizio del 1950. Infatti alcuni ricercatori avevano notato che tali effetti erano attenuati dalla presenza di albumina di siero bovina (BSA), una molecola che mostra un'alta capacità di legame per gli acidi grassi [Pressman BC e Lardy HA, 1956; Hulsman WC et al, 1960].

Successivamente si identificò che gli acidi grassi non esterificati a lunga catena (FFA) erano i reali agenti disaccoppianti “naturali” [Wojtczak L, 1976; Wojtczak L e Schönfeld P, 1993] ed in particolare la loro potenzialità dipendeva dalla lunghezza della catena e dal loro grado di insaturazione [Wojtczak L, 1976; Zborowski J e Wojtczak L, 1963].



Gli studi successivi, portarono a concludere che gli FFA hanno apparentemente tre effetti separati:

1. disaccoppiamento della respirazione mitocondriale dalla sintesi di ATP;
2. permeabilizzazione della membrana mitocondriale interna ai soluti;
3. inibizione dell'adenina nucleotide traslocasi (responsabile di una riduzione delle molecole di ADP consumato per ogni ossigeno consumato o rapporto ADP/O).

La differenza fondamentale tra l'effetto disaccoppiante degli acidi grassi e quella dei classici disaccoppianti sintetici, come l'FCCP e il dinitrofenolo che agiscono da protonofori, è il piccolo effetto degli acidi grassi sul potenziale di membrana. Una possibile spiegazione per quest'ultimo effetto come pure per il decremento del pH mitocondriale è stato suggerito da Wrigglesworth e coll. [Wrigglesworth JM et al, 1993]. Questi ricercatori trovarono che l'oleato può catalizzare il trasporto del  $K^+$  e del  $H^+$  attraverso il doppio strato lipidico con un meccanismo che prevede che l'acido grasso possa traslocare un protone o un catione rispettivamente come acido associato (AH) o come coppia ionica ( $A^-X^+$ ). La direzione del trasporto sarà determinata dalla polarità del gradiente cationico.

La velocità del trasporto dipenderà dalla natura dell'acido grasso e dal particolare catione della coppia ionica. Viene altresì proposto che la velocità di movimento dell'acido indissociato sia più elevata di quella della

coppia ionica e di quella della forma anionica dell'acido grasso dissociato. La presenza di un potenziale di membrana accelererà la traslocazione della specie anionica. Secondo questo meccanismo, quindi, l'effetto disaccoppiante sarebbe la conseguenza di un afflusso di  $H^+$  nella matrice mitocondriale con conseguente diminuzione del potenziale di membrana; in questo modo una parte dell'energia derivata dall'incrementato flusso di elettroni attraverso la catena respiratoria, dovuto agli acidi grassi, sembra essere dissipata con un meccanismo simile al disaccoppiamento.

Studi successivi suggerirono che gli acidi grassi sono in grado di incrementare la conduttanza protonica nei mitocondri, interagendo con alcuni componenti della membrana mitocondriale interna. Infatti il gruppo di Skulachev osservò che l'ADP ed alcuni inibitori dell'adenina nucleotide traslocasi (ANT) erano in grado di abolire parte dell'effetto disaccoppiante del palmitato [Dedukhova VI et al, 1991]. Tali evidenze portarono gli autori ad ipotizzare che l'ANT potesse essere coinvolta nel disaccoppiamento mediato dagli acidi grassi.

In particolare Schönfeld utilizzando uno specifico inibitore dell'attività del carrier ANT, quale la carbossiatrattiloside (CAT), evidenziò una correlazione tra il grado di attivazione del carrier stesso ed il disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi [Schönfeld P, 1990]. Una tale correlazione è stata confermata paragonando la capacità degli acidi grassi

di disaccoppiare i mitocondri che presentavano un differente contenuto di ANT. In particolare, in tale studio è stato evidenziato che il maggior contenuto del trasportatore ed una sua maggiore attività, coincidono con la più alta stimolazione della respirazione nello stato a riposo basale, da parte degli acidi grassi e con una più alta sensibilità alla CAT. D'altra parte, mitocondri isolati da un mutante di lievito che risultava “mancante di ANT”, risultarono essere insensibili al disaccoppiamento dovuto agli acidi grassi [Polčic P et al, 1997].

L'azione protonofora ed ionofora degli acidi grassi è efficientemente impedita da concentrazioni millimolari di ioni  $Mg^{2+}$  nel mezzo esterno; si è ipotizzato [Shinohara Y et al, 1995] che ciò sia dovuto alla formazione del complesso ione magnesio-acidi grassi all'interno della membrana, che rimane così immobilizzato sulla sua superficie.

In genere gli inibitori dell'ANT, quali ad esempio la CAT, non aboliscono completamente l'effetto disaccoppiante degli acidi grassi a lunga catena, ciò indica che il meccanismo che coinvolge l'ANT non è il solo responsabile della dissipazione del gradiente protonico elettrochimico mitocondriale. Infatti, inibitori e/o substrati di altri due trasportatori mitocondriali quali glutammato/aspartato e dicarbossilato, sono in grado di inibire parte del disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi [Skulachev VP, 1998 (a)].

La natura della conduttanza protonica è stata ben descritta per il tessuto adiposo bruno (BAT).

Il BAT è il sito anatomico maggiormente responsabile dell'alta velocità metabolica riscontrata nei ratti acclimatati al freddo [Rothwell NJ e Stock MJ, 1979; Himms-Hagen J, 1990]. Tale tesi è sostenuta dall'evidenza che il BAT, tessuto pressoché atrofico in condizioni normali, subisce in risposta all'esposizione al freddo e per stimolazione da parte del sistema nervoso simpatico (SNS), ed in particolare della noradrenalina (NA), profonde modificazioni morfologiche e funzionali. Infatti, misurazioni "in vivo" condotte da Foster e Frydman [Foster DO e Frydman ML, 1978] avevano indicato che, a dispetto della sua piccola massa totale (1-2% del peso corporeo nei ratti adattati al freddo), la produzione di calore del BAT sotto l'influenza delle catecolammine giustificava più del 60% dell'alta velocità metabolica dei ratti adattati al freddo.

Nel 1960 è stato mostrato che la conduttanza protonica indotta poteva spiegare l'incrementata attività termogenica del BAT dei roditori, in risposta all'esposizione al freddo e a diete iperlipidiche [Rothwell NJ e Stock MJ, 1979; Himms-Hagen J, 1990]. Questi risultati portarono alla ricerca ed all'identificazione della proteina responsabile della conduttanza protonica nel BAT. Nel 1978, è stato dimostrato che una proteina della membrana mitocondriale, chiamata quindi proteina disaccoppiante (UCP) o

termogenina, ed in seguito rinominata UCP1, era responsabile dell'attività termogenica del BAT [Nicholls DG et al, 1978].

In seguito all'esposizione al freddo, si verifica, infatti nel BAT un aumento della concentrazione dell'UCP1; è stato suggerito che tale proteina forma un canale (normalmente inibito dalla guanosina di fosfato, GDP [Nicholls DG, 1979]) capace di aumentare il passaggio passivo di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna dissipando, sotto forma di calore, il gradiente protonico determinato dall'ossidazione dei substrati energetici nella catena respiratoria, offrendo così una via di rientro alternativa per i protoni rispetto a quella rappresentata dall'ATP sintetasi [Klaus S et al, 1991; Cannon B e Nedergaard J, 1985]: in tal modo l'energia accumulatasi nel gradiente elettrochimico protonico non viene conservata come energia chimica sottoforma di ATP ma si rende disponibile come energia termica. E' stato proposto che questo meccanismo sia attivato anche nella termogenesi indotta dalla dieta. Si è poi visto che, a differenza di quanto accade nei ratti esposti al freddo, l'aumentata capacità termogenica del BAT, riscontrata nei ratti iperfagici non è dovuta ad una maggiore sintesi della proteina UCP1 [Desantels M e Himms-Hagen J, 1979; Himms-Hagen J et al, 1981], ma ad uno smascheramento dei siti di conduttanza protonica già esistenti sui mitocondri del tessuto [Ashwell M et al, 1984].

Dal momento dell'isolamento dell'UCP1 sono stati condotti molti studi i cui risultati hanno dimostrato che la trascrizione del gene dell'UCP1 è stimolata dall'AMP ciclico e la proteina risultante è attivata dagli acidi grassi [Ricquier D et al, 1991]. L'UCP1 lega anche i nucleotidi purinici (in particolare GDP), che sembrano inibire la sua funzione di traslocatore di protoni. Gli acidi grassi attivano l'UCP1 spostando il legame con i nucleotidi purinici e permettendo il passaggio dei protoni. In questo modo il gradiente protonico non è più utilizzato per formare ATP, ma per produrre calore.

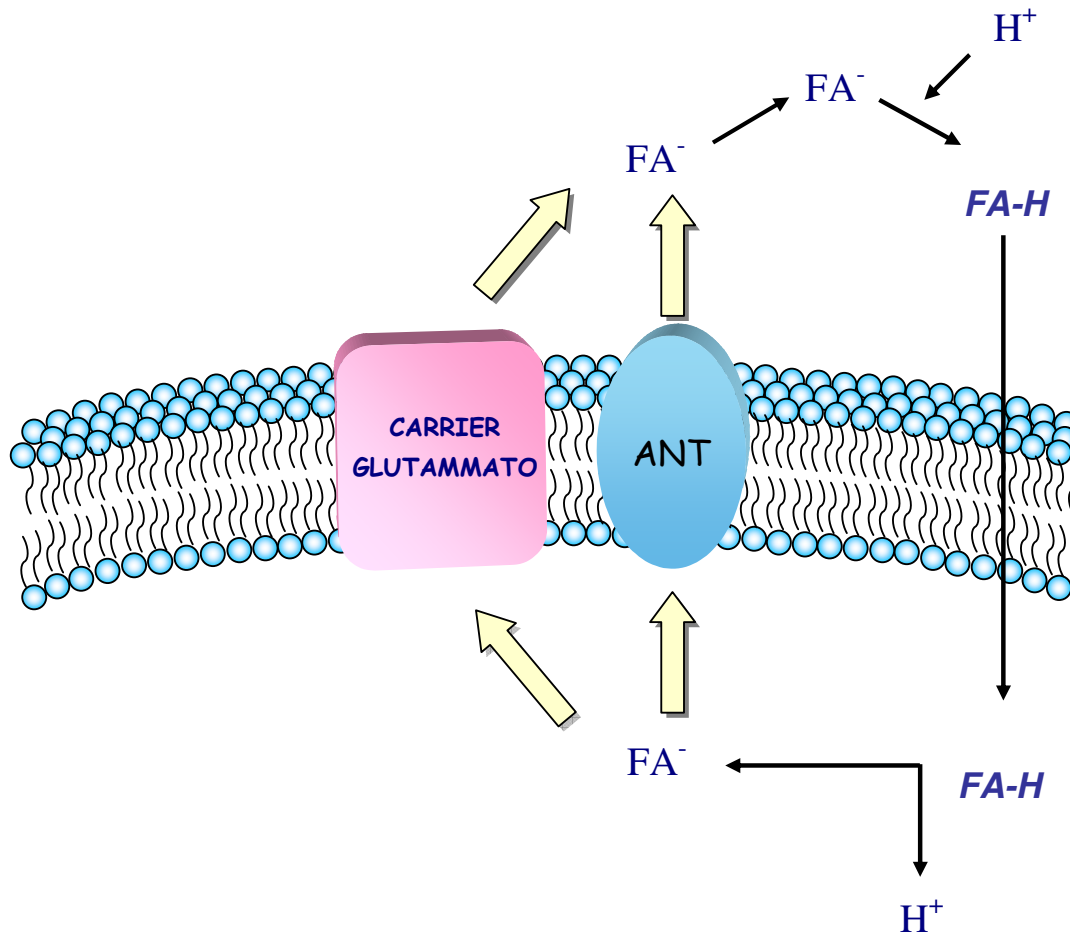
Tuttavia il meccanismo d'azione dell'UCP1 come catalizzatore del trasporto dei protoni non è ancora completamente conosciuto.

Sono stati postulati due modelli per spiegare il meccanismo molecolare dell'UCP1 [Klingenberg M e Winkler E, 1994; Garlid KD et al, 1996]:

- l'UCP1 agirebbe come trasportatore protonico e gli acidi grassi sarebbero degli attivatori allosterici del trasporto protonico stesso [Klingenberg M e Winkler E, 1994].
- l'UCP1 agirebbe da trasportatore degli acidi grassi in forma anionica, un processo chiamato ciclo degli acidi grassi (*figura 6*).

**Figura 6**

**Conduttanza protonica mitocondriale indotta dagli acidi grassi**



In effetti, secondo questa teoria gli anioni degli acidi grassi (che essendo carichi, non riescono a permeare la membrana mitocondriale interna) sono trasportati fuori dalla matrice dall'UCP1 o da altri trasportatori mitocondriali come l'ANT o il trasportatore glutammato/aspartato e dicarbossilato. Gli acidi grassi nello spazio intermembrana legano i protoni e rientrano nella matrice attraverso il doppio strato fosfolipidico della membrana. Gli acidi grassi a livello della superficie interna della membrana mitocondriale interna per effetto della differenza di pH vengono deprotonati (in questo modo si ha il passaggio di protoni dallo spazio intermembrana alla matrice e quindi il disaccoppiamento), l'acido grasso anionico formatosi viene traslocato di nuovo verso lo spazio intermembrana tramite l'UCP1 o gli altri sistemi proteici, ed il ciclo ricomincia [Garlid KD et al, 1996].

In entrambi i modelli, il risultato finale è una diminuzione del gradiente protonico attraverso la membrana mitocondriale interna.

La scoperta di proteine disaccoppianti, omologhe all'UCP1 e presenti in altri tessuti oltre che nel BAT, ha dato inizio a numerose ricerche atte ad identificare se esse possano essere responsabili di un incremento della conduttanza protonica basale e/o inducibile nei vari tessuti.

Nel 1997 una nuova UCP altamente omologa (59%) all'UCP1, e chiamata UCP2 [Fleury C et al, 1997; Boss O et al, 1997], fu identificata anche



nell'uomo. La sua espressione è ubiquitaria, infatti, l'mRNA dell'UCP2 è presente in molti tessuti quali il BAT, il tessuto adiposo bianco (WAT), il muscolo, il cervello, il cuore, l'intestino, il rene, il timo, la milza, le cellule  $\beta$  del pancreas, ma non è presente negli epatociti, inoltre è presente in molti tipi cellulari come adipociti, miociti, linfociti, macrofagi [Fleury C et al, 1997; Gimeno RE et al, 1997]. Il gene dell'UCP2 è localizzato sul cromosoma 7 del topo, e sul cromosoma 11 dell'uomo, accanto alla regione associata al diabete e all'obesità [Solanes G et al, 1997].

Successivamente è stata scoperta l'UCP3 [Boss O et al, 1997; Vidal-Puig et al, 1997], una proteina omologa sia dell'UCP1 sia dell'UCP2 [Boss O et al, 1997; Vidal-Puig et al, 1997], in quanto la sua sequenza aminoacidica è identica per il 52% all'UCP1 e per il 73% all'UCP2. Tale proteina è presente nel muscolo scheletrico umano e dei ratti, e in questi ultimi è presente anche nel BAT, nel tessuto adiposo bianco e nel cuore; la sua espressione è regolata dall'introito calorico, dagli ormoni tiroidei e dall'esposizione al freddo [Gong DW et al, 1997; Larkin S et al, 1997].

Nel cervello è stata inoltre identificata un'altra proteina disaccoppiante l'UCP4 [Nicholls DG e Locke RM, 1984; Mao W et al, 1999].

Ipotizzando che all'analogia strutturale tra le diverse UCP possa corrispondere un'analogia funzionale e tenendo in considerazione le conoscenze raggiunte fino ad oggi circa la modalità d'azione dell'UCP1

nel BAT, si ritiene che l'UCP2 e l'UCP3 possano svolgere un ruolo di primaria importanza nella spesa energetica e nel controllo della conduttanza protonica indotta mitocondriale negli organi e tessuti in cui tali proteine sono espresse.

Gli studi in favore di un'attività disaccoppiante di queste proteine sono quelli che hanno mostrato che i topi che sovraesprimono UCP3 sono iperfagici e magri e mostrano una diminuita efficienza mitocondriale, mentre i topi mancanti d'UCP3 mostrano una ridotta conduttanza protonica mitocondriale [Gong DW et al, 2000; Vidal-Puig A et al, 2000].

Comunque l'attività biochimica e il ruolo biologico di queste UCP non sono ancora completamente chiarite.

### **I mitocondri sono una permanente fonte delle specie reattive dell'ossigeno**

I mitocondri sono da una parte i maggiori produttori di radicali liberi e dall'altra sono il principale bersaglio dei loro effetti dannosi. I radicali liberi si formano nelle cellule sia in seguito alle loro reazioni metaboliche sia in seguito a stimoli esterni (radiazioni ionizzanti, elevata tensione di ossigeno, sostanze chimiche, farmaci, stress di vario genere).

In special modo le *specie reattive dell'ossigeno (ROS)* sono specie chimiche con un singolo elettrone spaiato in un orbitale esterno; l'energia creata da questa configurazione instabile viene liberata durante la reazione

con molecole vicine organiche ed inorganiche, come gli acidi nucleici, le proteine e i lipidi e, queste molecole sono convertite a loro volta in radicali liberi determinando un danno cumulativo. Tale configurazione dei ROS è conseguente ad una riduzione parziale della molecola di ossigeno, la quale necessita di quattro elettroni per potersi ridurre ad acqua. Dalla riduzione dell' $O_2$  da parte di un singolo elettrone si produce il radicale superossido  $O_2^{\bullet -}$ ; mentre dalla riduzione da parte di 2 elettroni si forma perossido di idrogeno  $H_2O_2$ .

La maggiore sorgente del radicale ione superossido cellulare ( $O_2^{\bullet -}$ ), che produce  $H_2O_2$  tramite la reazione di dismutazione e le specie idrossiliche ( $\bullet OH$ ) altamente reattive tramite la reazione di Fenton, è la catena respiratoria, localizzata nella membrana interna dei mitocondri [Maklashina E et al, 2004]. Le osservazioni che, nei mitocondri isolati, gli elettroni possano fuoriuscire dalla catena respiratoria sotto forma di radicali superossidi ( $O_2^{\bullet -}$ ) ha portato all'assunzione che la formazione di  $O_2^{\bullet -}$  è obbligatorio come sottoprodotto della respirazione [Staniek K e Nohl H, 2000]. Durante il passaggio degli elettroni dal complesso I e II fino alla citocromo ossidasi, si ha una maggiore produzione di ROS quando la velocità di trasporto degli elettroni diminuisce. La formazione dei ROS è tanto maggiore, sia nello Stato 4 sia nello Stato 3 della respirazione, quanto più è imponente la limitazione imposta al flusso di elettroni da parte del

$\Delta\mu\text{H}^+$  [Maklashina E et al, 2004]. Nonostante tutto, il principale sito di produzione del superossido è l'ubichinone [Wallace DC, 1992; Quant PA et al, 1991] e la sua forma ridotta, l'ubichinolo, mostra proprietà antiossidanti. E' stato suggerito che l'ubisemichinone ( $\text{SQ}^{\bullet-}$ ), formatosi sul lato citosolico del complesso III si sposta verso potenziali redox negativi. Questo cambiamento stabilisce le condizioni termodinamiche che permettono ad un elettrone di fluire verso un possibile  $\text{O}_2$  [Staniek K e Nohl H, 2000].

### **Danni causati dai radicali liberi a livello mitocondriale**

Le specie reattive dell'ossigeno sono studiate a fondo per essere la causa della patogenesi di varie malattie. Quasi dal 3 al 10% dell'ossigeno utilizzato dai tessuti è convertito nel suo intermedio reattivo, il quale danneggia il funzionamento delle cellule e dei tessuti [Noor R et al, 2002]. Superossidi,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , radicali idrossilici e radicali dell'ossigeno sono prodotti continuamente a velocità elevate come prodotti del metabolismo aerobico. Essi danneggiano le macromolecole cellulari, che includono DNA, proteine e lipidi generando altri radicali. L'accumulo di tali danni può contribuire all'invecchiamento e ad altre malattie degenerative. I deficit di energia cellulare causati da declini nella funzione mitocondriale possono indebolire le normali attività cellulari e compromettere l'abilità delle cellule ad adattarsi a vari stress fisiologici.

### *Danni ossidativi al DNA mitocondriale*

I livelli del danno ossidativo al DNA mitocondriale isolato dal fegato di ratto o da varie regioni del cervello umano sono maggiori rispetto a quelli del DNA nucleare [Richter C et al, 1998; Mecocci P et al, 1993]. Questi livelli superiori di danno ossidativo e mutazioni nel DNA mitocondriale sono attribuiti alla localizzazione del DNA vicino ai siti della membrana mitocondriale interna in cui si formano gli ossidanti. Inoltre il DNA mitocondriale non presenta un tipo di impacchettamento simile al DNA nucleare con proteine istoniche, che svolgono anche un ruolo protettivo nei confronti del DNA da parte di agenti esterni capaci di danneggiarlo. Le mutazioni che avvengono nel DNA mitocondriale si accumulano per l'assenza di sistemi di riparazione del DNA.

Il DNA mitocondriale codifica per un numero limitato di polipeptidi della membrana mitocondriale interna, per tRNA e rRNA coinvolti nella sintesi di proteine mitocondriali [Ames BN et al, 1995]. Inoltre, presenta poche sequenze non codificanti, perciò ogni mutazione provoca degli effetti evidenti nella funzione mitocondriale [Hansford RG, 1983]. E' stata evidenziata anche una diminuzione dei livelli di mRNA. Probabilmente l'accumulo di mutazioni e delezioni del DNA mitocondriale in seguito all'attacco da radicali, porta ad un abbassamento dei livelli trascrizionali, con conseguente alterazione nella sintesi dei complessi respiratori e nella

sintesi dell'ATP.

### *Danni ossidativi alle proteine mitocondriali*

In una condizione di stress anche il numero di proteine mitocondriali danneggiate da radicali aumenta. L'accumulo di proteine con gruppi carbonilici ossidate, porta a delle reazioni inter/intra-molecole con gruppi amminici di altre proteine, con la conseguente perdita della loro funzionalità fisiologica e biochimica [Ames BN et al, 1995]. Tutto ciò potrebbe portare anche alla perdita della produzione di energia ed all'aumento della produzione di ossidanti.

*L'aconitasi*, un enzima del ciclo di Krebs, è un esempio di proteina danneggiata dai radicali liberi. Essa contiene nel suo sito attivo un "cluster" [4Fe-4S] che è il principale bersaglio dei superossidi.

È stato proposto che il "cluster" [4Fe-4S]<sup>2+</sup>, è ossidato dallo ione superossido, formando il "cluster" inattivo [3Fe-4S]<sup>1+</sup> a causa del rilascio reversibile del ferro [Vasquez-Vivar J et al, 2000]. In questa reazione i probabili prodotti sono ferro (II) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, perciò, l'inattivazione dell'aconitasi mitocondriale, mediata dal superossido, potrebbe incrementare la formazione del radicale idrossilico (•OH) attraverso la reazione di Fenton nei mitocondri [Vasquez-Vivar J et al, 2000]. Questa selettiva e reversibile distruzione dei "cluster" [4Fe-4S], può essere usata per stimare la concentrazione dei superossidi nelle cellule di mammifero.

[Longo VD et al, 2000].

*Danni ossidativi ai lipidi della membrana mitocondriale*

Le membrane svolgono un ruolo centrale nella bioenergetica delle cellule. Infatti, i mitocondri presentano una membrana con caratteristiche di permeabilità altamente selettiva: tale possibilità di selezione fa in modo che le vie del metabolismo avvengano in compartimenti separati. Inoltre la membrana mitocondriale fornisce anche il sostegno per il sistema di traduzione dell'energia [Hansford RG, 1983]. Cambiamenti nella permeabilità di membrana sono dovuti ad un incremento della perossidazione lipidica [Ames BN et al, 1995], che porta ad una diminuzione della fluidità di membrana rendendola più rigida. Nelle frazioni della membrana microsomale e mitocondriale di fegato isolate da roditori sembra esserci un declino progressivo nella quantità di acido linoleico [Laganieri S e Yu BP, 1993]. Questo cambiamento è accompagnato ad un incremento nella quantità di acidi grassi polinsaturi a lunga catena che mostrano un superiore grado di insaturazione e sono più sensibili alle reazioni di ossidazione rispetto all'acido linoleico. Infatti, l'aumento di fosfolipidi con un maggior grado di insaturazione rende le membrane più suscettibili alla perossidazione.

La fosfolipasi A<sub>2</sub> sembra essere importante per il riparo dei lipidi danneggiati ossidativamente. L'attività della fosfolipasi A<sub>2</sub> nella membrana

mitocondriale interna incrementa in risposta all'aumento della produzione di ossidanti [Hatch GM et al, 1993]. E' stato suggerito che la fosfolipasi A<sub>2</sub> sia un enzima di riparazione che catalizza la rimozione di lipidi ossidati dalle membrane. Senza tale attività riparatoria i lipidi perossidati potrebbero accumularsi, provocando un aumento della permeabilità della membrana nonché una perdita del controllo respiratorio mitocondriale.

### **Sistemi di difesa dai radicali liberi**

Per evitare l'intossicazione da  $O_2^{\bullet -}$  e dei prodotti della sua conversione in ROS, i mitocondri sono forniti di un sistema di difesa che previene la formazione dei ROS e rimuove quelli formati [Skulachev VP, 1997; Skulachev VP, 1998 (a)]. Due meccanismi di difesa particolarmente importanti sono quelli della *superossido dismutasi* e del *leggero disaccoppiamento*.

1. La *superossido dismutasi* (SOD), localizzata nella matrice mitocondriale, converte, tramite la reazione di dismutazione, il radicale  $O_2^{\bullet -}$  in  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Il perossido d'idrogeno può uscire dal mitocondrio perché è molto più permeabile del radicale  $O_2^{\bullet -}$ . L'importanza della SOD è evidenziata dal fatto che una mutazione del gene che codifica per la SOD, provocando una sua inattivazione, conduce in molti casi allo sviluppo di malattie umane come il morbo di Parkinson , il morbo



di Alzheimer, il cancro, la sindrome di Down, la cataratta e una serie di disordini neurologici [Noor R et al, 2002].

2. Il *leggero disaccoppiamento* può contrastare la formazione dei radicali liberi. Il leggero disaccoppiamento da parte degli acidi grassi liberi, mediato dai trasportatori anionici mitocondriali come l'antiporto ATP/ADP (ANT), l'antiporto aspartato/glutammato, proteine disaccoppianti, etc., mantiene il potenziale protonico mitocondriale sotto al livello soglia richiesto per stimolare la produzione di  $O_2^{\bullet -}$  da parte del complesso I e III [Skulachev VP, 1998 a].

Altri meccanismi con i quali l'organismo cerca di difendersi da una eccessiva produzione di radicali liberi sono:

- un'elevata attività della *citocromo ossidasi*, la quale, operando ad alta velocità anche a basse concentrazioni di ossigeno, può far effettivamente diminuire la concentrazione di ossigeno. In questo modo la concentrazione di ossigeno viene mantenuta ad un livello basso, tale da non essere sufficiente per un'elevata velocità di formazione di  $O_2^{\bullet -}$  da parte degli enzimi della catena respiratoria [Skulachev VP, 1997; Skulachev VP, 1998 (a); Skulachev VP, 2001];
- il *citocromo c*, che catalizza l'ossidazione del  $O_2^{\bullet -}$  di nuovo ad ossigeno se il citocromo è desorbito dalla faccia esterna della

membrana mitocondriale interna nello spazio intermembrana [Skulachev VP, 1998 (a)];

- la *glutathione perossidasi* e la *catalasi* mitocondriale che decompongono l'  $H_2O_2$  nella matrice;
- *Tocoferol*, *CoQH<sub>2</sub>*, *ascorbato* e altri antiossidanti di basso peso molecolare che direttamente eliminano i ROS [Skulachev VP, 1997].

Ovviamente tutti questi meccanismi non interferiscono con l'adempimento delle normali funzioni mitocondriali.

È da sottolineare che l'attivazione di questi meccanismi di difesa sono fondamentali per evitare l'insorgenza dei notevoli danni causati da un aumento di radicali liberi nella cellula.

### **Popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico: mitocondri subsarcolemmatici ed intermiofibrillari**

Studi condotti sul muscolo cardiaco e scheletrico hanno dimostrato che in questi tessuti sono presenti due popolazioni mitocondriali, una localizzata direttamente sotto il sarcolemma (*mitocondri subsarcolemmatici*, *SS*) ed un'altra tra le miofibrille (*mitocondri intermiofibrillari*, *IMF*) [Zborowski J e Wojtczak L, 1963].

È possibile isolare separatamente le due frazioni. Per esempio, i mitocondri SS sono stati isolati dal cuore con processore tissutale Polytron, mentre i

mitocondri IMF sono stati ottenuti con una digestione con nagarse del restante tessuto [Wrigglesworth JM et al, 1993]. Questi risultati sono stati convalidati da osservazioni al microscopio elettronico che mostravano, in seguito al trattamento col Polytron, una rottura del sarcolemma con liberazione dei sottostanti mitocondri, ma con ritenzione dei mitocondri intatti tra le miofibrille. La microscopia elettronica dei mitocondri isolati ha mostrato che entrambi i tipi di mitocondri mantengono la loro integrità strutturale durante la procedura di isolamento [Wrigglesworth JM et al, 1993]. L'isolamento delle due popolazioni di mitocondri ha permesso una loro analisi separata. Tale studio ha dimostrato che queste popolazioni di mitocondri non solo presentano una localizzazione diversa nella cellula, ma anche differenze biochimiche e funzionali. Infatti, i risultati hanno indicato una maggiore attività della membrana mitocondriale interna e degli enzimi della matrice negli IMF rispetto agli SS. Le attività specifiche della succinico deidrogenasi e della citrato sintasi sono più alte nei mitocondri IMF rispetto a quelli SS, mentre quelle della carnitin-palmitoiltransferasi e dell' $\alpha$ -glicerolo fosfato deidrogenasi sono approssimativamente le stesse in entrambe le popolazioni.

La capacità ossidativa dei mitocondri IMF è più alta di quella dei mitocondri SS con tutti i substrati utilizzati sperimentalmente [Iossa et al, 2002; Wrigglesworth JM et al, 1993].

Studi sulle caratteristiche biochimiche dei mitocondri IMF e SS isolati dal muscolo scheletrico sono potenzialmente molto importanti ai fini della comprensione dei ruoli che queste due frazioni mitocondriali occupano all'interno della cellula. Il muscolo scheletrico rappresenta un buon modello per la sua capacità di alterare il suo contenuto in mitocondri in risposta all'attività contrattile. Alterazioni della richiesta energetica, come ad esempio quelle imposte dall'attività contrattile, giocano un ruolo importante nel determinare la distribuzione cellulare e il contenuto in mitocondri. Numerosi esperimenti indicano che l'aumento o la diminuzione dell'attività muscolare portano a differenti adattamenti dei mitocondri SS e IMF [Dedukhova VI et al, 1991]. Ulteriori lavori hanno dimostrato che in alcuni stati fisiologici e patologici, una delle due popolazioni di mitocondri muscolari può aumentare di numero [Schönfeld P, 1990; Freaque HC, 1995]. Questo fenomeno suggerisce la presenza di un meccanismo compensatorio dei livelli degli organelli in risposta a specifiche stimolazioni della cellula [Wrigglesworth JM et al, 1993].

In conclusione le specifiche differenze biochimiche tra mitocondri IMF e SS del muscolo scheletrico sembrano coincidere con differenze nella capacità respiratoria, misurata utilizzando inibitori sito-specifici della catena di trasporto degli elettroni. Le differenze biochimiche possono essere in parte attribuite a un differente andamento della sintesi proteica

mitocondriale. Occorrono ulteriori studi per identificare le specifiche proteine coinvolte, così come per mettere in relazione tali differenze con i possibili ruoli funzionali che queste due frazioni mitocondriali potrebbero giocare nel metabolismo energetico della cellula [Dedukhova VI et al, 1991].

# **SCOPO DELLA TESI**

L'attività di ricerca che ho condotto nel corso della mia tesi sperimentale è stata incentrata sullo studio delle risposte adattative a stimoli fisiologici in cui è diminuita la spesa energetica, come la restrizione calorica, e la rialimentazione dopo un periodo di restrizione calorica.

Ho in particolare rivolto la mia attenzione alla valutazione degli effetti di stimoli suddetti sulle caratteristiche strutturali e funzionali delle due popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico, uno dei tessuti di maggior rilievo dal punto di vista metabolico, allo scopo di conoscere il ruolo svolto da tale organo nella regolazione della spesa energetica.

La spesa energetica corporea è strettamente dipendente dallo stato nutrizionale dell'organismo. Infatti, un periodo di limitato apporto di nutrienti provoca una diminuzione adattativa nella spesa energetica dell'intero organismo, che è in parte attribuita ad un aumento dell'efficienza metabolica [Ramsey JJ et al, 2000]. Questo adattamento permette all'organismo un risparmio energetico, in quanto riduce la velocità alla quale le riserve lipidiche vengono consumate.

Tale riduzione della spesa energetica è di particolare importanza perché fa parte di un meccanismo regolatorio, che per bilanciare un deficit di energia, aumenta l'efficienza metabolica sopprimendo la termogenesi. In questo modo si riduce la velocità con cui è utilizzata l'energia corporea, consentendo così una sopravvivenza più lunga. È importante sottolineare

che la diminuzione della spesa energetica persiste nel periodo di rialimentazione, immediatamente successivo ad un periodo di restrizione calorica [Dulloo AG e Girardier L, 1990], permettendo così un rapido ripristino delle riserve di grasso corporeo allorquando il cibo ritorna disponibile.

Variazioni della spesa energetica dell'intero organismo riflettono paralleli cambiamenti soprattutto a livello di quegli organi e tessuti, che maggiormente contribuiscono alla spesa energetica corporea. Tra i tessuti che meritano maggiore attenzione vi è sicuramente il muscolo scheletrico, il tessuto più abbondante del corpo e il suo metabolismo contribuisce per circa il 30% alla spesa energetica a riposo nel ratto [Dulloo AG e Jacquet J, 1998]. A tal proposito, l'analisi del flusso sanguigno con la tecnica delle microsfele accoppiato a misure del consumo di ossigeno artero-venoso ha mostrato che il muscolo scheletrico è un importante sito di risparmio energetico nei ratti a digiuno [Ma SWY e Foster DO, 1986]. Analogamente, nel caso della restrizione calorica e della successiva rialimentazione, l'ipotesi più accreditata identifica nel muscolo scheletrico il principale sito di riduzione della termogenesi [Dulloo AG et al, 1995; Dulloo AG, 2005].

Tra i fattori che influenzano l'efficienza mitocondriale, un importante ruolo è attribuito alla permeabilità della membrana mitocondriale interna ai



protoni. Infatti, quando vi è un'elevata permeabilità della membrana mitocondriale interna ai protoni, questi possono attraversare la membrana mitocondriale interna verso la matrice, impedendo così la sintesi di ATP e promuovendo la dispersione dell'energia sotto forma di calore. Questo fenomeno costituisce il cosiddetto “*disaccoppiamento*” associato con un'efficienza mitocondriale diminuita. E' ben chiaro che i protoni possono rientrare nella matrice mitocondriale attraverso una via di conduttanza non specifica, denominata *conduttanza protonica basale*. Tale via localizzata a livello della membrana mitocondriale interna di tutti i mitocondri, contribuisce (a circa il 20%) alla spesa energetica a riposo dei mammiferi [Rolfe DFS e Brand MD, 1996]. Tuttavia, nonostante molti studi siano stati eseguiti, la base molecolare della conduttanza protonica basale non è ancora ben conosciuta. E', invece, ben noto che gli acidi grassi possono agire come disaccoppianti naturali della fosforilazione ossidativa, generando una via di *conduttanza protonica indotta* che è correlata alla concentrazione di acidi grassi liberi all'interno della cellula che, nella forma protonata, diffondono nei mitocondri, per poi fuoriuscire come anioni attraverso alcuni trasportatori mitocondriali presenti nella membrana interna, come il trasportatore dei nucleotidi adeninici (ANT), il carrier del glutammato e le cosiddette proteine disaccoppianti: UCP2 ed UCP3 [Schulacev VP, 1991; Jezek P et al, 1998]. La conduttanza protonica

indotta dagli acidi grassi, essendo correlata con la concentrazione intracellulare degli acidi grassi, che a sua volta, è associata alla loro concentrazione plasmatica, è in relazione alle condizioni metaboliche dell'organismo.

Vi sono, quindi, due tipi di conduttanza protonica, che contribuiscono all'efficienza del compartimento mitocondriale. La combinazione della conduttanza protonica basale e del disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi potrebbe quindi contribuire all'efficienza del sistema mitocondriale. L'incompleto accoppiamento tra l'ossidazione del substrato e la produzione di ATP fa sì che i mitocondri siano il sito primario cellulare di produzione di calore. Un aumento del disaccoppiamento induce un incremento della produzione di calore, con conseguente dispersione di energia e maggiore utilizzo di substrati energetici. La situazione inversa induce un risparmio di substrati energetici con conseguente calo della termogenesi.

Sulla base dell'ipotesi che il muscolo scheletrico sia un importante sito effettore della ridotta termogenesi che avviene in situazioni di diminuita spesa energetica, ho ritenuto interessante studiare come variazioni delle caratteristiche energetiche e strutturali dei mitocondri del muscolo scheletrico potessero contribuire alla ridotta termogenesi. E' importante tenere presente che le cellule muscolari sono caratterizzate dalla presenza

di due distinte popolazioni mitocondriali, una localizzata al di sotto del sarcolemma, da cui il nome di *mitocondri subsarcolemmatici (SS)* e l'altra associata alle miofibrille, da cui il nome di *mitocondri intermiofibrillari (IMF)*. E' noto in letteratura che queste due popolazioni mitocondriali presentano caratteristiche biochimiche e funzionali differenti [Iossa S et al, 2001; Bizeau ME et al, 1998; Cogswell AM et al, 1993; Krieger DA et al, 1980; Yajid F et al, 1998]. Tali differenze tra i mitocondri IMF e SS suggeriscono che queste due popolazioni possano giocare un differente ruolo metabolico nell'economia della cellula. Partendo da tali premesse, appare quindi evidente che la determinazione sia dell'efficienza metabolica delle due popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico, sia la determinazione della massa proteica mitocondriale consentirebbe di acquisire nuove conoscenze sul ruolo svolto da tale tessuto nella regolazione della spesa energetica e potrebbe fornire il meccanismo molecolare alla base del rapido ripristino delle riserve di grasso corporeo allorquando il cibo ritorna disponibile, dopo un periodo di restrizione calorica.

Alla luce di tali considerazioni, ho determinato la massa proteica mitocondriale, la conduttanza protonica basale e quella mediata dagli acidi grassi nei mitocondri IMF e SS isolati dal muscolo scheletrico nei ratti

sottoposti a restrizione calorica per due settimane e a successiva rialimentazione per una settimana.

Ho determinato inoltre la respirazione mitocondriale in presenza di substrati FAD e NAD dipendenti in modo tale da coinvolgere i differenti siti di ingresso degli equivalenti ridotti nella catena respiratoria mitocondriale.

E', inoltre, noto che l'entità della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) dipende dal grado di accoppiamento della fosforilazione ossidativa, e perciò dall'efficienza. Infatti, un leggero disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa, mantenendo il potenziale protonico mitocondriale sotto il livello soglia richiesto per produrre i radicali dell'ossigeno, è funzionale nell'ostacolare l'eccesso di produzione dei ROS. Pertanto, per capire se i trattamenti di restrizione calorica e rialimentazione agendo sull'efficienza mitocondriale comportassero, anche, variazioni della formazione di radicali liberi e quindi un aumento del danno ossidativo cellulare, ho determinato l'attività dell'aconitasi mitocondriale, un enzima del ciclo di Krebs sensibile all'esposizione ai radicali liberi, e della superossido dismutasi, uno dei sistemi utilizzati dai mitocondri per metabolizzare i ROS. Ho inoltre effettuato anche misure di bilancio energetico e della composizione corporea. Contemporaneamente

ho condotto una caratterizzazione metabolica dei ratti misurando i livelli plasmatici di insulina, glucosio e acidi grassi non-esterificati (NEFA).

# **PARTE SPERIMENTALE**

## **Animali e disegno sperimentale**

Negli esperimenti condotti in questa tesi sono stati utilizzati ratti maschi appartenenti al ceppo Sprague-Dawley (Charles River, Calco, Como, Italia), di cui:

- un gruppo del peso medio di circa 220 g è stato sottoposto a restrizione calorica per due settimane (gruppo FR);
- un altro gruppo (gruppo RF), sempre di circa 220 g di peso medio, dopo due settimane di restrizione, è stato rialimentato

Per ciascun gruppo sono stati utilizzati ratti di controllo (WM), alimentati ad libitum, aventi lo stesso peso dei ratti trattati, alla fine del periodo sperimentale.

Mentre la restrizione calorica nei ratti FR è stata realizzata somministrando un pasto giornaliero pari al 50% del loro normale introito calorico (misurato in esperimenti paralleli condotti su ratti della stessa età alimentati ad libitum), nella rialimentazione ai ratti viene fornita la stessa quantità media di cibo introdotta dai ratti di controllo dello stesso peso. In entrambi i casi il cibo utilizzato è il mangime standard di laboratorio in pellet.

All'inizio del trattamento ed alla fine del periodo *sperimentale* alcuni ratti sono stati sacrificati per la determinazione del contenuto energetico e della composizione corporea. Le carcasse di questi ratti sono state autoclavate,

pesate, sminuzzate e infine omogeneizzate (con una diluizione 1:2 p/v) con un Polytron (circa 15000 rpm per 5 minuti/100g di carcassa). Aliquote dell'omogenato così ottenuto sono state congelate e in seguito utilizzate per le misure del bilancio energetico e della composizione corporea.

I restanti animali sono stati sacrificati al termine della restrizione e della rialimentazione per realizzare le misure sui mitocondri SS ed IMF isolati, dal muscolo scheletrico. In particolare, ai ratti cui è stata eseguita un'iniezione intraperitoneale di anestetico (cloralio idrato alla dose di 40mg/100g di peso corporeo), rapidamente è stato prelevato dalle zampe posteriori il muscolo scheletrico (quadricipite, gastrocnemio, soleo, tibiale anteriore),

Durante l'intero periodo sperimentale i ratti sono stati stabulati singolarmente ad una temperatura di  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ , e sottoposti ad un ciclo circadiano artificiale di 12 ore di luce e 12 ore di buio. Il trattamento, la stabulazione ed il sacrificio dei ratti sono stati condotti nel rispetto delle direttive del Ministero della Sanità Italiano.

### **Bilancio energetico**

Durante tutto il periodo del trattamento (restrizione calorica o rialimentazione) sono stati controllati sia il peso corporeo che la quantità di cibo introdotta, sottraendo dalla quantità aggiunta giornalmente quella



eventualmente caduta nella gabbia durante il pasto. E' stato quindi possibile calcolare l'introito calorico lordo, ottenuto considerando il valore energetico della dieta standard di laboratorio (15,88 KJ/g), misurato con una bomba calorimetrica (calorimetro adiabatico Parr). L'utilizzo di tale strumento ha consentito la determinazione del contenuto energetico anche delle feci, prodotte durante tutto il periodo di trattamento: l'energia metabolizzabile introdotta è stata quindi calcolata sottraendo all'introito calorico lordo sia il contenuto energetico delle feci che l'energia persa con le urine (circa il 4%). Per effettuare le misure con la bomba calorimetrica, i campioni sono stati essiccati, ridotti in polvere e pressati al fine di ottenere pasticche di peso non superiore ai 200 mg. Per la misura ogni pasticca è messa su un piattello di platino, in contatto con un filo di nichel agganciato a due uncini di platino, attraverso cui è fatta passare la corrente elettrica. Questo sistema è posto in un recipiente d'acciaio circondato da un volume noto di acqua distillata, il tutto completamente separato dall'esterno da un'intercapedine di materiale isolante. Nel recipiente d'acciaio è compresso ossigeno alla pressione di 35 atm, per rendere possibile la combustione del campione. Il calore fornito dall'ossidazione dei substrati presenti nel campione fa innalzare la temperatura del un volume noto di acqua distillata, che circonda il recipiente d'acciaio. Ogni misura può essere suddivisa in tre fasi:

- una prima fase in cui viene dato alle varie parti del calorimetro il tempo di raggiungere l'equilibrio termico ( $T_i$ );
- una seconda fase in cui il campione è ossidato e nel sistema si ha una variazione di temperatura ( $T_f$ );
- una terza fase in cui il calorimetro raggiunge nuovamente l'equilibrio termico.

Attraverso il registratore della temperatura collegato al termometro immerso nell'acqua, viene misurato l'innalzamento termico ( $\Delta T$ ), come differenza tra la temperatura massima alla fine combustione ( $T_f$ ) e quella prima della combustione ( $T_i$ ). La capacità termica dell'apparecchio è stata determinata utilizzando come standard l'acido benzoico, dopodiché, conoscendo il peso delle pastiglie di campione e il  $\Delta T$  prodotto dalla loro combustione, è calcolato il loro contenuto energetico, espresso come KJ prodotti per grammo di campione secco.

Dalle aliquote dell'omogenato dell'animale essiccato in stufa a 60°C per 48 ore, è stato possibile determinare il contenuto energetico della carcassa, sempre mediante l'utilizzo della bomba calorimetrica.

A questo punto è stato possibile calcolare il guadagno energetico corporeo come differenza tra il contenuto energetico dei ratti alla fine del trattamento e quello calcolato sul gruppo di ratti sacrificati all'inizio del periodo sperimentale; la spesa energetica, in base all'equazione del bilancio

energetico, è stata calcolata come differenza tra l'energia introdotta e quella guadagnata. L'efficienza metabolica lorda è stata ottenuta dal rapporto percentuale tra il guadagno energetico e l'energia metabolizzabile assunta.

### **Misura della composizione corporea**

Dall'omogenato di carcassa vengono prelevate delle aliquote per la determinazione del contenuto di acqua, lipidi e proteine. Il contenuto di acqua è ottenuto per differenza tra il peso delle aliquote di omogenato prima e dopo l'essiccamento in stufa a 60°C per 48 ore. Il contenuto lipidico è invece calcolato mediante il metodo di Folch [Folch et al, 1957], che consiste in una estrazione iniziale dei lipidi dall'omogenato di carcassa, diluito 20 volte in una miscela cloroformio/metanolo (2:1), seguita da filtrazione; al filtrato ottenuto vengono aggiunti 0,2 volumi di NaCl 0,29% e dopo un'agitazione vigorosa di 30 minuti e una centrifugazione a 1000 g per 20 minuti (21°C), si osserva la separazione di una fase acquosa superiore ed una fase lipidica inferiore. A questo punto la fase acquosa viene aspirata con una pompa e l'interfaccia viene lavata con una soluzione contenente cloroformio/metanolo/NaCl (3:48:47), con lo scopo di eliminare i contaminanti non lipidici dall'estratto; nel passaggio successivo la fase lipidica viene versata in palloni di vetro di cui è noto il peso, per ottenere l'evaporazione dei solventi organici, mediante l'utilizzo dell'evaporatore

rotante Heidolph. Si risale così al peso dei lipidi per grammo di carcassa e, attraverso il coefficiente 39,2 KJ/g è convertito il contenuto lipidico in KJ di energia corporea depositata sotto forma di lipidi.

Il contenuto proteico della carcassa è stato calcolato per differenza tra il contenuto energetico totale e quello dovuto ai lipidi.

Il guadagno lipidico (o quello proteico), espresso in KJ, viene quindi calcolato come differenza tra l'energia depositata sotto forma di lipidi (o proteine) che è stata misurata nei ratti alla fine del trattamento e quella determinata nei ratti all'inizio del periodo sperimentale.

Per calcolare il costo di deposito di lipidi e proteine, ovvero i KJ di energia spesi per il loro deposito, si moltiplicano i rispettivi guadagni per il coefficiente 0,36 KJ/KJ nel caso dei lipidi e 1,25 KJ/KJ per le proteine. Infine, la spesa energetica netta, che esprime il costo di mantenimento delle funzioni vitali dell'organismo, si ottiene sottraendo alla spesa energetica il costo di deposito totale (la somma dei costi di deposito di lipidi e proteine).

### **Preparazione dei mitocondri subsarcolemmatici e intermiofibrillari dal muscolo scheletrico**

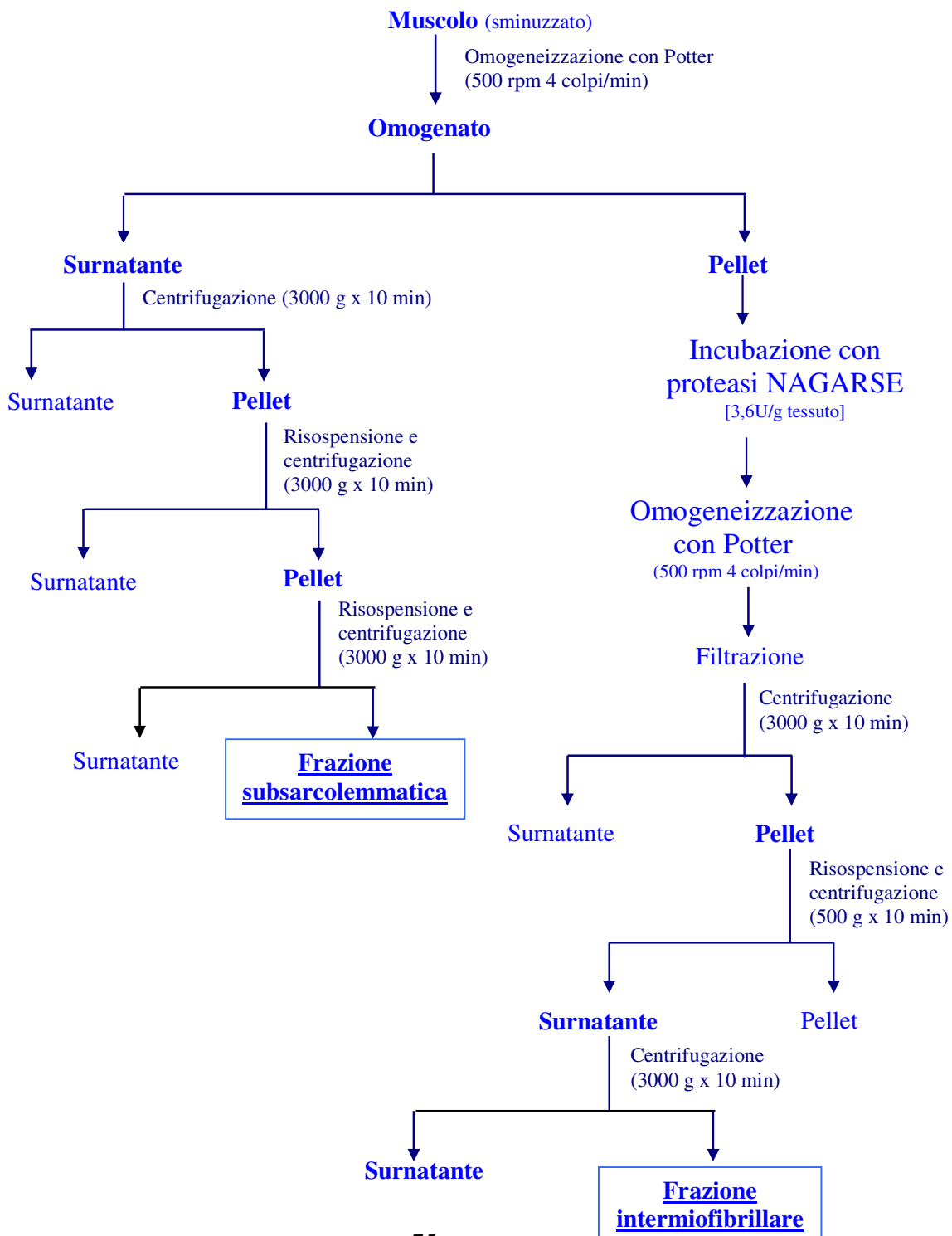
Il muscolo prelevato viene pesato, dopo aver eliminato l'eccesso di grasso e connettivo (*figura 7*). In seguito il muscolo viene sminuzzato in una soluzione contenente KCl 100 mM, Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1

mM, EGTA 5 mM, 0,1% (p/v) di albumina serica libera da acidi grassi (BSA), a pH 7,5. I frammenti tissutali così ottenuti vengono omogenizzati con la stessa soluzione (1:8 p/v) in un omogenizzatore Potter Elvehjem (Heidolph, Kelheim, Germania) regolato a 500 rpm (4 colpi per un minuto). L'omogenato restante è sottoposto a centrifugazione a 500 g per 10 minuti a 4°C: i mitocondri IMF insieme alle componenti più pesanti della cellula (nuclei, frammenti di membrana e cellule rimaste intatte) precipiteranno, mentre nel surnatante rimarranno sospesi i mitocondri SS. E', dunque, a questo punto che le preparazioni si separano:

- per i mitocondri SS, dalla centrifugazione a 3000 g per 10 minuti a 4°C del surnatante si ottiene un pellet, che poi viene sottoposto ad un lavaggio per due volte ed infine risospeso in un mezzo contenente saccarosio 250 mM, Tris 50 mM, 0,1% di BSA, a pH 7,5;
- per i mitocondri IMF, il pellet derivato dalla prima centrifugazione viene trattato con proteasi nagarse (3,6 U/g di tessuto) per 5 minuti ad una temperatura di 4°C, la sospensione viene poi omogenizzata, filtrata attraverso una garza sterile e centrifugata a 3000 g per 10 minuti. Il pellet viene risospeso e centrifugato a 500 g per 10 minuti a 4°C, ed il surnatante risultante è ricentrifugato a 3000 g per 10 minuti. Il pellet ottenuto viene lavato una sola volta e risospeso in un mezzo contenente saccarosio 250 mM, Tris 50 mM, 0,1% di BSA, a pH 7,5.

**Figura 7**

**Procedura d'isolamento delle due frazioni mitocondriali di muscolo scheletrico**



## **Dosaggio Proteico**

Aliquote delle due frazioni mitocondriali, diluite 1:25, sono state sottoposte ad un dosaggio proteico, condotto secondo il metodo di Hartree, una modifica al metodo di Lowry, [Hartree EF, 1967], per determinare la concentrazione di proteine mitocondriali nei mitocondri isolati. Tale dosaggio è di tipo colorimetrico, quindi determina la formazione di un colore la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione proteica nel campione.

Tale metodo combina la reazione del biureto con quella del Folin-Ciocalteu, ed il colore che si sviluppa proviene dalla riduzione degli acidi fosfotungstico e fosfomolibdico a blu di tungsteno e di molibdeno, operata dal complesso Cu-proteina, dal triptofano e dalla tirosina delle proteine in ambiente alcalino. La modifica rispetto al metodo di Lowry sta in un aumento della concentrazione di tartrato di sodio-potassio e nell'impiego di temperature più elevate (50°C). Tali variazioni rendono la metodica più sensibile e consentono una correlazione lineare tra assorbanza e concentrazione proteica per un più ampio intervallo di valori di concentrazione. Lo standard utilizzato è la BSA.

## **Misura dell'attività respiratoria sui mitocondri isolati**

L'attività respiratoria nei mitocondri isolati è stata misurata con un metodo

polarografico, realizzato attraverso l'uso dell'elettrodo ad ossigeno di Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA). Tale elettrodo è costituito da un catodo di platino e un anodo di argento, immersi in una soluzione di KCl (ponte salino) e separati dalla soluzione in esame tramite una membrana di teflon. L'ossigeno diffonde attraverso la membrana dalla soluzione presente nella camera di misura al compartimento dell'elettrodo. Quando si applica agli elettrodi un voltaggio di 0,5–0,8 volts, l'ossigeno al catodo viene ridotto da 4 elettroni prodotti all'anodo, originando così una corrente proporzionale alla quantità di ossigeno presente nella soluzione in esame. La tensione di ossigeno al catodo, quindi tende ad azzerarsi promuovendo la diffusione dell'ossigeno verso il catodo. Per questo l'elettrodo di Clark risulta utile nelle misure dei rapidi cambiamenti dell'utilizzazione dell'ossigeno da parte dei sistemi cellulari e subcellulari. Le misure sono state realizzate in camere termostate ad una temperatura di 30°C utilizzando un mezzo di incubazione contenente KCl 30 mM,  $\text{MgCl}_2$  6 mM, saccarosio 75 mM, EDTA 1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 mM, 0,1% (p/v) di BSA, a pH 7,0.

Prima di procedere alla misura del consumo di ossigeno, i mitocondri sono indotti a consumare i substrati endogeni, mediante una preincubazione di qualche minuto, alla fine della quale sono aggiunti i substrati respiratori, quali il succinato (10 mM), come substrato FAD dipendente e il rotenone



(3,75  $\mu$ M), come inibitore del primo complesso della catena di trasporto della membrana mitocondriale interna; il glutammato (10 mM) come substrato NAD dipendente e il malato (2,5 mM); il palmitoil-CoA (40  $\mu$ M) come substrato lipidico e carnitina (2mM) + malato (2.5 mM).

La velocità del consumo di ossigeno è stata misurata in presenza di quantità saturanti di ATP (0,67 mM), (*Stato 3* della respirazione), che rappresenta la massima velocità del consumo di ossigeno. La velocità del consumo di ossigeno è stata misurata anche in assenza di ATP, determinando il cosiddetto *Stato 4* della respirazione.

Il rapporto di controllo respiratorio (*RCR*) è calcolato come rapporto tra *Stato 3* e *Stato 4*, e rappresenta un indice dell'integrità dei mitocondri.

Il consumo di ossigeno è espresso in ngatomi al minuto per mg di proteine mitocondriali.

### **Misura del potenziale di membrana sui mitocondri isolati**

Il potenziale di membrana mitocondriale è stato misurato utilizzando la lettura spettrofotometrica, ottenuta mediante uno spettrofotometro (JASCO) a doppia lunghezza d'onda, della safranina, un colorante che in virtù della sua carica elettrica si lega alla membrana mitocondriale in maniera proporzionale al potenziale [Nedergaard J, 1983]. Lo spettrofotometro adoperato è programmato in modo tale che la lunghezza d'onda di riferimento (533 nm) coincida con il punto isosbestico della

safranina, cioè quel punto dello spettro di assorbimento in cui la molecola di colorante mostra la stessa assorbanza sia nello stato legato sia in quello non legato alla membrana mitocondriale. La lunghezza d'onda di lettura è invece 511 nm. Per risalire al potenziale di membrana dai valori dell'assorbanza si effettuano misure dell'assorbanza della safranina in presenza di valinomicina 3 mM, un trasportatore specifico del potassio, e di quantità crescenti di KCl necessarie ad alterare la concentrazione esterna di potassio nel range 0,1-20 mM. A questo punto si costruisce una retta di taratura che mette in relazione le variazioni di assorbanza al logaritmo della concentrazione di potassio esterna, e che, quindi, consente di risalire alla concentrazione extra ed intramitocondriale di tale ione. Per estrapolazione da tale retta, infatti, si ricava la concentrazione interna di potassio, considerando che quando la variazione di assorbanza della safranina è nulla, anche il potenziale di membrana è pari a zero e quindi, in base all'equazione di Nernst, le concentrazioni di potassio esterna ed interna si equivalgono [Nedergaard J, 1983]. Ottenute le concentrazioni di potassio esterna ed interna alla membrana mitocondriale, mediante l'equazione di Nernst ( $\Delta\Psi = 61 \text{ mV} \times \log ([K^+]_{in}/[K^+]_{out})$ ) si può calcolare il potenziale di membrana dei mitocondri e realizzare un grafico per mettere in relazione i valori di potenziale di membrana con l'assorbanza della safranina. Per

interpolazione da tale curva si potranno ottenere i valori del potenziale di membrana mitocondriale nelle varie condizioni sperimentali utilizzate.

### **Misura della conduttanza protonica basale**

L'applicazione del metodo di Brand [Brand MD, 1990] ha consentito la valutazione della conduttanza protonica basale dei mitocondri isolati: tale metodica consiste in una titolazione della respirazione con il succinato a partire dallo Stato 4, in presenza di oligomicina, con quantità crescenti di malonato, un inibitore competitivo del secondo complesso della catena respiratoria, la succinico deidrogenasi, e permette di determinare le variazioni del potenziale di membrana associate alle variazioni del consumo di ossigeno ottenute in queste condizioni. Per poter determinare sperimentalmente la conduttanza protonica basale si adopera l'oligomicina, un antibiotico capace di abolire il flusso di protoni attraverso l'ATP sintetasi, prevenendo il passaggio dei protoni attraverso la subunità  $F_o$ . In questo modo si fa sì che il flusso protonico valutato dipenda solo dalla conduttanza protonica basale.

Per una determinazione accurata della conduttanza protonica basale, può essere valutata la risposta cinetica del potenziale di membrana mitocondriale a variazioni del consumo di ossigeno ottenute diminuendo progressivamente le reazioni di ossidazione del succinato dei mitocondri

nello Stato 4 con un inibitore della catena di trasporto degli elettroni quale il malonato. Al diminuire della velocità di ossidazione del substrato diminuisce la velocità di pompaggio di protoni all'esterno e quindi anche il valore del potenziale di membrana. La variazione del consumo di ossigeno in funzione del potenziale di membrana, in un mitocondrio che respira in assenza di fosforilazione, ci permette di valutare la variazione cinetica della conduttanza protonica in funzione del potenziale di membrana. Infatti, le curve di titolazione così ottenute sono una misura indiretta della conduttanza protonica perché, in stato stazionario, la velocità del consumo di ossigeno (cioè il flusso protonico in uscita) nei mitocondri in assenza di fosforilazione equivale al flusso protonico in entrata dovuto alla conduttanza protonica. In effetti, il potenziale di membrana è uno dei due componenti della forza proton motrice ( $\Delta p$ ), l'altro è la differenza di potenziale chimico protonico ( $\Delta pH$ ).

Sperimentalmente è possibile abolire il  $\Delta pH$  facendo in modo che il  $\Delta p$  risulti uguale al  $\Delta \Psi$ : a questo scopo si utilizza la nigericina, uno scambiatore  $H^+/K^+$ , in grado di annullare la differenza di pH a livello della membrana mitocondriale interna, e di conseguenza abolire la differenza di potenziale chimico, trasformandola in differenza di potenziale.

Le misure sono state effettuate a 30°C in una soluzione contenente LiCl 30 mM,  $MgCl_2$  6 mM, saccarosio 75 mM, EDTA 1 mM, Tris- $PO_4$  20 mM,

succinato 10 mM, rotenone 3,75  $\mu$ M, oligomicina 2  $\mu$ g/ml, safranina O (83,3 nmol/mg) e nigericina (80 ng/ml) 0,1% (p/v) di BSA, a pH 7,0. La titolazione dello Stato 4 della respirazione è stata eseguita mediante sequenziali aggiunte di malonato fino a 5 mM.

### **Misura della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi**

Per avere informazioni più precise sul disaccoppiamento indotto dagli acidi grassi è stata anche effettuata la determinazione della cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi in analogia a quella effettuata per la conduttanza protonica basale. Tale determinazione è stata ottenuta titolando la respirazione ed il potenziale di membrana in presenza di oligomicina, succinato e palmitato con quantità crescenti di malonato fino a 0,6 mM per i mitocondri IMF e 1,07 mM per i SS. Inoltre, il contributo dei vari sistemi proteici mitocondriali responsabili dell'effetto disaccoppiante del palmitato è stato determinato valutando la capacità di ligandi e/o inibitori specifici di tali proteine di abolire l'effetto disaccoppiante del palmitato. Infatti il contributo dell'ANT, del carrier del glutammato e di altri sistemi è stato valutato misurando l'effetto riaccoppiante della carbossiatractiloside (CAT, 10 nmol/mg proteine), del glutammato (7nM) e della BSA (0,4% p/v).

### **Misura del contenuto di UCP3 nei mitocondri isolati**

Aliquote di 40 µg delle proteine mitocondriali vengono denaturate in un buffer contenente Tris 60 mM a pH 6,8 e saccarosio 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanolo 4%, blu di bromofenolo 0,06% e caricate su di un gel di poliacrilammide-SDS al 12% con un marker proteico (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Dopo la corsa elettroforetica in un buffer contenente Tris 50 mM a pH 8,3 e glicina 384 mM, SDS 0,1%, le proteine vengono trasferite dal gel su una membrana di polivinilidene difluoride (PVDF) (Immobilon-P, Millipore, Switzerland) a 0,8 mA/cm<sup>2</sup> per 90 minuti. La membrana viene poi prebloccata in un buffer contenente PBS (soluzione tamponata con fosfato, NaCl 13,7 mM, KCl 0,3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 mM; latte 5%; 0,5% di Tween 20) per un'ora e poi incubata per una notte a 4°C con una soluzione di un anticorpo policlonale specifico per la proteina UCP3 (Chemicon International, CA, USA) diluito 1:3000 nello stesso buffer. Infine la membrana viene lavata tre volte per 15 minuti in una soluzione di PBS, 0,5% di Tween 20, e tre volte per 15 minuti in una soluzione di PBS; viene poi incubata per un'ora a temperatura ambiente con una soluzione di anticorpo secondario, diluito 1:10000, coniugato con una fosfatasi alcalina (Promega Corporation, WI, USA). La membrana viene lavata come appena descritto, risciacquata in acqua distillata ed incubata a temperatura ambiente in una soluzione

contenente CDP-Star (Sigma-Aldrich, MO, USA), un substrato chemiluminescente diluito 1:5. Le bande vengono ottenute esponendo una pellicola autoradiografica (Kodak, Eastman Kodak Company, NY, USA) alla membrana; i dati, invece, sono acquisiti mediante un densitometro e quantificati con l'UN-SCAN-IT Software (Silk Scientific Corporation, Utan, USA).

### **Determinazione della massa proteica mitocondriale**

La misura della massa proteica mitocondriale si può ottenere seguendo due vie: 1) dalla misura dell'attività di un enzima marker mitocondriale, la citrato sintasi, determinata sia negli omogenati sia nei mitocondri isolati dal muscolo scheletrico, 2) dalla valutazione della resa mitocondriale.

Seguendo il primo approccio sperimentale, l'attività della citrato sintasi misurata nell'omogenato ed espressa per g di muscolo riflette il prodotto della massa proteica mitocondriale e dell'attività specifica dell'enzima citrato sintasi, ottenuta attraverso la misura dell'attività di tale enzima nei mitocondri SS ed IMF ed espressa per mg di proteine mitocondriali. Inoltre, per determinare la massa proteica mitocondriale in ciascuna popolazione mitocondriale, l'attività della citrato sintasi misurata nei mitocondri SS e IMF è espressa per g di tessuto iniziale. In esperimenti preliminari era stato valutato il grado di purezza dei mitocondri IMF ed SS, misurando la possibile contaminazione da parte di altre ATPasi contenute

nei residui di membrane. I risultati di tali esperimenti hanno mostrato un buon grado di purezza dei suddetti mitocondri.

Nel secondo metodo di stima della massa proteica mitocondriale è stata valutata la resa proteica mitocondriale andando ad esprimere in g di tessuto iniziale, i mg di proteina mitocondriale ottenuta dall'isolamento delle popolazioni mitocondriali SS e IMF. I cambiamenti nella resa mitocondriale possono dipendere da due condizioni: a) cambiamenti nella quantità dei mitocondri nel tessuto iniziale; b) cambiamenti nelle caratteristiche di sedimentazione degli organelli. Per escludere la possibilità che i cambiamenti nella resa mitocondriale possano essere dovuti alla perdita dei mitocondri durante la procedura d'isolamento, si stima la resa dell'attività della citrato sintasi nelle varie aliquote prelevate durante la procedura di isolamento dei mitocondri SS o IMF.

La citrato sintasi è stata determinata in accordo con Srere [Srere PA, 1969]. La misura si realizza incubando, alla temperatura di 30°C, i mitocondri o l'omogenato, diluiti 1:10 in Triton 0,5%, in un buffer costituito da DTNB (1 mM), Acetil-CoA (10 mM), Ossalacetato (10 mM). Inoltre la misura è realizzata in presenza del Triton 0,5%, allo scopo di rompere la membrana mitocondriale e solubilizzare l'enzima per poterlo dosare.



La determinazione dell'attività della citrato sintasi è stata effettuata spettrofotometricamente monitorando l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 412 nm ogni 30 secondi per tre minuti.

L'attività della citrato sintasi è calcolata usando il coefficiente di estinzione molare  $\varepsilon = 13600 \text{ M}^{-1}$ . Quindi, dalla media dei  $\Delta A \text{ min}^{-1}$  per ogni campione, si calcola la molarità del CoA formatosi al minuto, corrispondente all'attività della citrato sintasi, per i mg di proteine mitocondriali o i g di tessuto incubati.

### **Determinazione dell'attività dell'aconitasi mitocondriale**

Il dosaggio dell'aconitasi è un metodo sensibile per misurare “in vivo” i danni prodotti dai radicali liberi sulla funzione delle macromolecole biologiche [Gardner PR, 2002]. Infatti l'aconitasi è particolarmente sensibile all'attacco e all'inattivazione da parte dei radicali ossigeno [Fridovich I, 1995; Flint DH e Allen RM, 1993; Gardner PR et al, 1997; Drapier JC e Hibbs JBJ, 1996], per cui la sua attività è danneggiata dalla presenza di elevati livelli di radicali liberi nel suo sito attivo, un cluster [4Fe-4S], che è il principale bersaglio dei radicali liberi. Il meccanismo di inattivazione dell'aconitasi da parte dei radicali liberi è il rilascio di ferro dal cluster [4Fe-4S]. L'aconitasi è un enzima del ciclo di Krebs, che catalizza la conversione reversibile di acido citrico in isocitrico, che viene poi ossidato dalla isocitrico deidrogenasi ad  $\alpha$ -chetoglutarato, con

formazione di NADP ridotto (NADPH). Il dosaggio dell'aconitasi viene effettuato spettrofotometricamente, misurando l'aumento di assorbanza a 340 nm dovuto alla formazione di NADPH.

Per il dosaggio si utilizzano solo campioni congelati in azoto liquido immediatamente dopo l'isolamento e conservati a -80°C, in quanto l'attività dell'aconitasi si danneggia in tempi molto brevi.

I campioni sono stati incubati a 25°C in un buffer costituito da Tris-HCl 50 mM a pH 7,4 e MnCl<sub>2</sub> 0,6 mM, NADP<sup>+</sup> 0,2 mM, sodio-citrato 30 mM e 2 U/ml di isocitrico deidrogenasi e la formazione di NADPH è stata seguita spettrofotometricamente a 340 nm a 25°C.

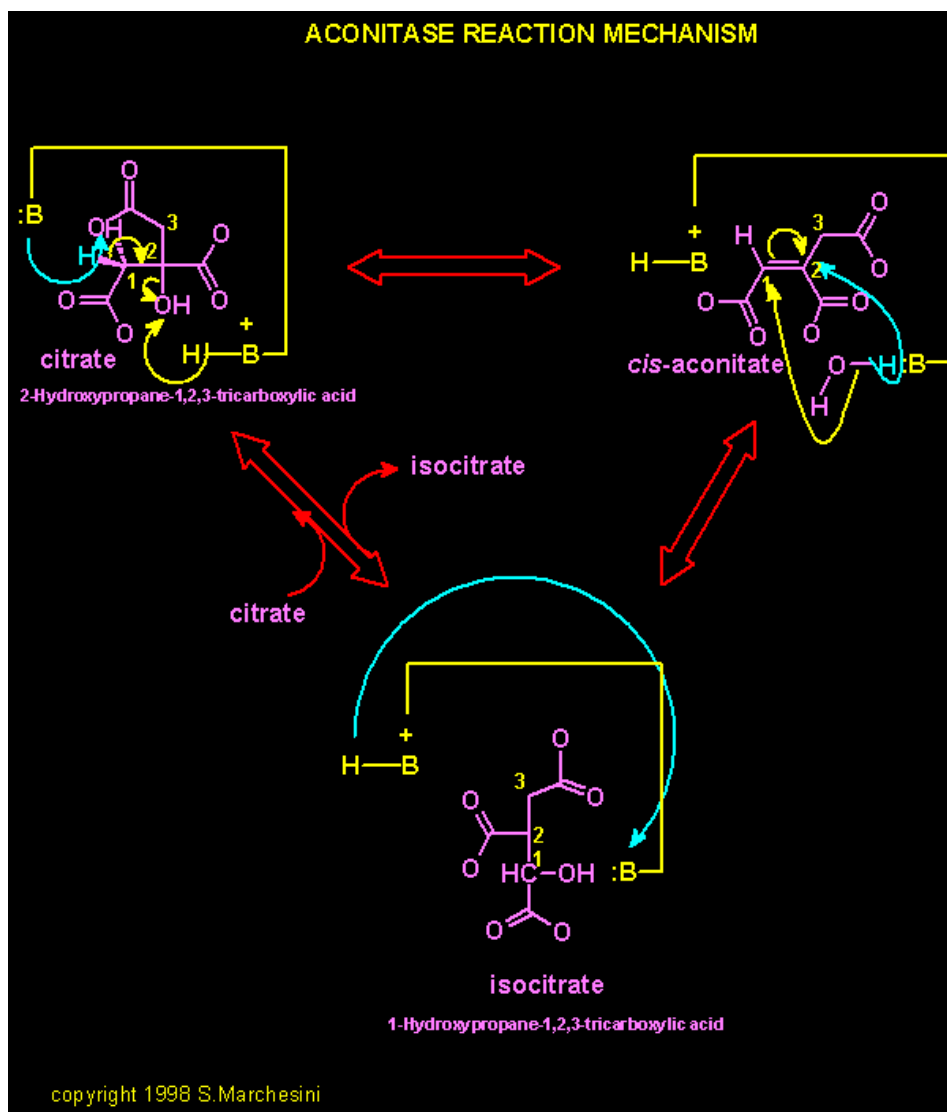
La misura è stata realizzata in presenza di Triton 1%, allo scopo di rompere la membrana mitocondriale e solubilizzare l'enzima per poterlo dosare.

L'attività dell'aconitasi è calcolata usando il coefficiente di estinzione molare  $\epsilon$  del NADPH,  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Il livello dell'attività dell'aconitasi misurata nell'estratto mitocondriale eguaglia l'aconitasi attiva (livello basale).

## Figura 8

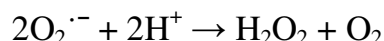
### Meccanismo di reazione dell'Aconitasi



L'aconitasi è un enzima di localizzazione mitocondriale, che catalizza l'isomerizzazione del citrato in isocitrato (attraverso la formazione di cis-aconitato) nel corso del ciclo di Krebs

## **Determinazione dell'attività della superossido dismutasi**

La superossido dismutasi è un enzima che catalizza la reazione:



Quindi ha il compito di ripulire la cellula dai radicali liberi e mantiene la concentrazione dei radicali ossigeno ad un livello straordinariamente basso in diverse cellule e organelli [Imlay J A e Fridovich I, 1991].

Il dosaggio della superossido dismutasi si realizza spettrofotometricamente andando a monitorare la velocità di riduzione del citocromo C, utilizzando il sistema xantina-xantina ossidasi come produttore di  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .

La superossido dismutasi, competendo con i radicali  $\text{O}_2^{\cdot-}$  che determinano la riduzione del citocromo C, provoca una diminuzione della velocità di riduzione del citocromo C.

Il dosaggio si effettua utilizzando il metodo descritto da Flohè ed Ötting [Flohè L e Ötting F, 1984].

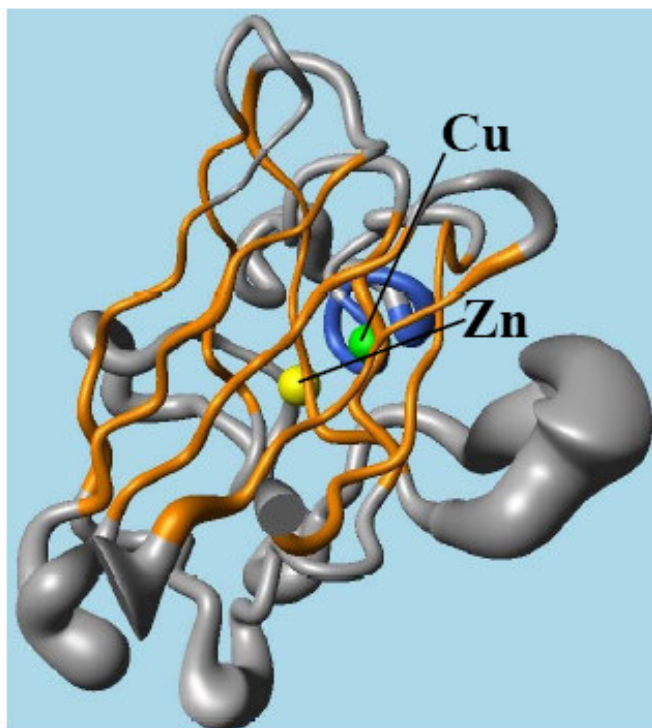
L'attività specifica della SOD è stata misurata utilizzando un buffer costituito da  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, EDTA 0,1 mM, KCN 2 mM, xantina 0,1 mM, NaOH 0,1 mM, citocromo C 20 mM e 0,0033 U/ml di xantina ossidasi.

Le misure sono state effettuate spettrofotometricamente (550 nm) a 25°C monitorando il decremento nella velocità di riduzione del citocromo C da

parte dei radicali liberi generati dal sistema xantina/xantina ossidasi [Flohè L e Ötting F, 1984]. L'attività della SOD, espressa come Unità/mg di proteine, viene calcolata tenendo presente che una Unità di superossido dismutasi è definita come la quantità di enzima che inibisce del 50% la riduzione del citocromo C.

### Figura 9

#### Struttura molecolare della Superossido Dismutasi.



Struttura in soluzione della superossido dismutasi umana in forma ridotta - proteina coinvolta in processi di degradazione di radicali. Biochemistry 1998

Il tubo in figura rappresenta il backbone della proteina (tanto più il diametro del tubo è piccolo quanto più il backbone della proteina è ben definito). Sono evidenziati: in arancio i  $\beta$ -sheets, in blu l' $\alpha$ -elica, ed in grigio i loops della proteina.

## **Determinazione dei livelli serici di NEFA, glucosio e insulina**

Trascorsi 30 minuti dal prelievo, il sangue è stato posto in apposite provette e centrifugato alla velocità di 5000 rpm per 10 minuti, alla temperatura di 20 °C.

Applicando questa procedura è stato possibile separare il siero, rappresentato dal surnatante, dalla parte corpuscolata del sangue, cioè il pellet.

I campioni di siero sono stati conservati ad una temperatura di -20°C fino al momento in cui sono stati utilizzati per la determinazione delle misure di interesse. In particolare si è provveduto alla misura dei livelli serici di NEFA, glucosio e insulina.

I NEFA e il glucosio sono stati valutati mediante un metodo enzimatico colorimetrico usando un kit commerciale (Roche Diagnostic, Italia per gli FFA e Pokler, Italia, per il glucosio).

I livelli di insulina sono stati, infine, determinati mediante il dosaggio ELISA che sfrutta il metodo del doppio anticorpo (sandwich) ed utilizza come enzima coniugato la perossidasi di rafano. In seguito all'aggiunta del substrato della perossidasi, si sviluppa un composto colorato la cui intensità è proporzionale alla quantità di enzima presente.

La resistenza all'insulina è stata valutata dall'indice HOMA =  $[\text{Glucosio (mg/dL)} \times \text{Insulina (mU/L)}] / 405$

## **Analisi statistica**

I dati sono le medie  $\pm$  ES di otto differenti ratti. Le analisi statistiche sono state compiute mediante l'uso del test T di Student. Il confronto tra le cinetiche della conduttanza protonica basale e indotta è stato effettuato tramite l'applicazione della regressione non lineare. Valori di probabilità minori di 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi. Tutte le analisi sono state effettuate usando il programma GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

# **RISULTATI**



I dati sul peso, sul contenuto di proteine e lipidi corporei, nonché sulla spesa energetica netta dei ratti a restrizione calorica (FR) e dei controlli dello stesso peso (WM) sono riportati nella *tabella 2*. Al termine delle due settimane di restrizione calorica, durante le quali la crescita si arresta, il peso corporeo ed il contenuto proteico, sono uguali nei ratti FR rispetto ai controlli WM; mentre il contenuto lipidico e la spesa energetica dei ratti FR risultano essere significativamente ridotte.

I risultati relativi alle misure del consumo di ossigeno, in presenza di un substrato NAD dipendente (glutammato), un substrato FAD dipendente (succinato) ed un substrato lipidico (palmitoil-CoA), sulle due popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico nei ratti a restrizione calorica e in quelli di controllo sono riportati in *tabella 3*. Alla fine della restrizione calorica, lo Stato 3 della respirazione dei mitocondri SS è significativamente più basso nei ratti a restrizione calorica rispetto ai controlli WM con il glutammato e il succinato, mentre non si osserva alcuna variazione significativa per i mitocondri IMF. Nessuna variazione significativa dello Stato 4 della respirazione è stata trovata in entrambe le popolazioni mitocondriali dei ratti a restrizione calorica rispetto ai controlli WM.

Nella *figura 10* sono riportati i risultati della conduttanza protonica basale, come cinetica delle variazioni del potenziale di membrana in funzione delle variazioni della respirazione, nei mitocondri di muscolo di ratti a restrizione calorica (FR) e dei controlli dello stesso peso (WM). I dati mostrano che, in seguito alla restrizione calorica, la cinetica della conduttanza protonica basale non subisce alcuna variazione significativa in entrambe le frazioni mitocondriali.

Nella *figura 11* è invece riportata la cinetica della conduttanza protonica indotta dal palmitato. Nei ratti FR non si osserva alcuna variazione significativa per i mitocondri SS rispetto ai controlli WM, mentre per gli IMF si osserva una conduttanza protonica indotta minore rispetto a quella dei ratti di controllo WM, in quanto ad ogni valore di consumo di ossigeno il potenziale di membrana rimane ad un valore più alto nei ratti FR rispetto ai ratti di controllo WM.

Il contributo dei vari sistemi proteici mitocondriali responsabili dell'effetto disaccoppiante del palmitato è riportato nella *tabella 4*, i risultati mostrano che nei mitocondri IMF e SS dei ratti FR, la diminuzione del potenziale di membrana può essere abolito completamente dall'aggiunta di CAT, uno specifico inibitore dell'ANT; mentre, nei ratti di controllo WM, l'ANT, il carrier del glutammato/aspartato ed altri trasportatori sono tutti coinvolti nella suddetta diminuzione.

In *figura 12* è riportato il contenuto della proteina UCP3, misurato mediante Western blot in entrambe le popolazioni mitocondriali. I risultati non mostrano alcuna variazione significativa nei ratti FR rispetto ai controlli WM.

Nella *figura 13* è riportata l'attività della citrato sintasi, un marker enzimatico mitocondriale, usato per la determinazione della massa proteica mitocondriale. Alla fine della restrizione calorica l'attività della citrato sintasi/g di tessuto è significativamente più bassa nei ratti FR rispetto ai controlli WM, sia nell'omogenato sia nei mitocondri SS ed IMF isolati dal muscolo scheletrico. Invece, nessuna differenza significativa dell'attività specifica della citrato sintasi/mg di proteine è stata ottenuta nei mitocondri SS e IMF.

Nella *figura 14* è riportata la resa dei mitocondri SS ed IMF, espressa in mg/g tessuto, il recupero dell'attività della citrato sintasi durante la procedura di isolamento mitocondriale. I risultati mostrano che la resa mitocondriale è più bassa nei ratti FR rispetto ai ratti di controllo WM per entrambe le popolazioni mitocondriali, ed inoltre il recupero dell'attività della citrato sintasi non è variato nei ratti FR rispetto ai controlli WM. Questi risultati nel loro insieme indicano che la massa proteica

mitocondriale del muscolo scheletrico è ridotta alla fine delle due settimane di restrizione calorica.

In *figura 15* è riportata l'attività specifica dell'aconitasi (mU/mg di proteine), e della superossido dismutasi (SOD) (U/mg di proteine), indici rispettivamente del danno ossidativo cellulare e delle difese antiossidanti.

Per entrambe le frazioni mitocondriali non si osservano variazioni dell'attività specifica dell'aconitasi nei ratti FR rispetto ai ratti di controllo WM. Mentre si osserva un incremento significativo dell'attività specifica della SOD per i mitocondri SS e IMF dei ratti FR rispetto ai controlli WM.

La caratterizzazione metabolica dei ratti FR rispetto ai ratti di controllo WM è stata ottenuta dalla misura dei livelli plasmatici di NEFA, insulina e glucosio. Tali risultati, riportati nella *tabella 5*, mostrano che i livelli plasmatici di NEFA e glucosio sono significativamente più bassi nei ratti FR rispetto ai ratti di controllo WM, mentre nessuna differenza è stata trovata per i livelli plasmatici di insulina. L'indice HOMA, un indice del livello di resistenza all'insulina, nei ratti FR è significativamente più basso rispetto ai ratti di controllo WM.

I dati sul peso, sulla quantità di proteine e lipidi corporei dei ratti rialimentati (RF) e dei controlli dello stesso peso (WM) sono riportati nella *tabella 6*. Al termine della settimana di rialimentazione, durante le quali i ratti RF introducono la stessa quantità di cibo dei controlli WM, tra i due

gruppi non si osservano differenze significative nel guadagno di peso corporeo e nella componente proteica. Al contrario i lipidi sono notevolmente aumentati nei ratti RF, rispetto ai controlli WM.

Nella *tabella 7* sono riportati i risultati relativi alle misure del bilancio energetico. In particolare si osserva che, mentre non ci sono variazioni significative nell'energia metabolizzabile introdotta nei ratti RF rispetto ai ratti di controllo WM, il guadagno energetico risulta aumentato significativamente, mentre la spesa energetica e la spesa energetica netta sono significativamente diminuite nei ratti RF rispetto ai ratti WM. L'accumulo preferenziale di grasso corporeo, quindi, nei ratti RF è dovuto ad un significativo aumento della loro efficienza energetica. Infine nella *tabella 7* è riportato il rapporto spesa energetica netta/energia metabolizzabile, indice dell'efficienza metabolica, che nei ratti RF rispetto ai controlli WM è significativamente più basso, in accordo con i dati precedenti.

I risultati relativi alle misure della respirazione mitocondriale sulle due popolazioni del muscolo scheletrico, nei ratti RF e in quelli di controllo WM sono riportati nella *tabella 8*. Alla fine della rialimentazione, lo Stato 3 della respirazione dei mitocondri SS è significativamente più basso nei ratti RF rispetto ai controlli WM con il glutammato e il palmitoil-CoA, ma non con il succinato. Mentre nei mitocondri IMF lo Stato 3 della

respirazione tende ad essere significativamente più alto nei ratti RF rispetto ai controlli WM utilizzando come substrato il succinato. Nessuna variazione significativa dello Stato 4 della respirazione è stata trovata in entrambe le popolazioni mitocondriali dei ratti rialimentati rispetto ai controlli WM.

Nella *figura 16* sono riportati i risultati della cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri di muscolo di ratti rialimentati per una settimana (RF) e dei controlli dello stesso peso (WM). I dati mostrano che, in seguito alla rialimentazione, la cinetica della conduttanza protonica basale non subisce alcuna variazione significativa nei mitocondri SS mentre risulta essere più alta per i mitocondri IMF dei ratti RF rispetto ai controlli WM, in quanto ad ogni valore di consumo di ossigeno il potenziale di membrana risulta essere più basso nei ratti RF rispetto ai controlli WM.

Nella *figura 17* è invece riportata la conduttanza protonica indotta dal palmitato. I dati mostrano che, in seguito alla rialimentazione, la cinetica della conduttanza protonica indotta risulta essere più alta per entrambe le popolazioni mitocondriali dei ratti RF rispetto ai controlli WM, in quanto ad ogni valore di consumo di ossigeno il potenziale di membrana risulta essere più basso nei ratti RF rispetto ai ratti di controllo WM. Il contributo dei vari sistemi proteici mitocondriali responsabili dell'effetto

disaccoppiante del palmitato è riportato nella *tabella 9*, i risultati mostrano che nei mitocondri IMF e SS dei ratti RF e dei relativi controlli WM, la diminuzione del potenziale di membrana può essere abolita principalmente dall'aggiunta di CAT, uno specifico inibitore dell'ANT, mentre in piccola parte dal carrier del glutammato/aspartato.

In *figura 18* è riportato il contenuto della proteina UCP3, misurato in entrambe le popolazioni mitocondriali. I risultati non mostrano alcuna variazione significativa nei ratti RF rispetto ai controlli WM.

Nella *figura 19* è riportata l'attività della citrato sintasi. Alla fine della rialimentazione l'attività della citrato sintasi/g di tessuto è più bassa nei ratti RF rispetto ai controlli WM, sia nell'omogenato sia nei mitocondri SS ed IMF isolati dal muscolo scheletrico. Queste differenze sono significative per l'omogenato e i mitocondri SS ma non per i mitocondri IMF. Invece, nessuna differenza significativa dell'attività specifica della citrato sintasi/mg di proteine è stata ottenuta nei mitocondri SS e IMF. Nella *figura 20* è riportata la resa dei mitocondri SS ed IMF, espressa in mg/g tessuto, e il recupero dell'attività della citrato sintasi. I risultati mostrano che la resa mitocondriale è più bassa nei ratti RF rispetto ai ratti di controllo WM per entrambe le popolazioni mitocondriali, tali differenze sono più pronunciate e statisticamente significative per i mitocondri SS mentre nessuna significatività è stata riscontrata per i mitocondri IMF. Il

recupero dell'attività della citrato sintasi non è variato nei ratti RF rispetto ai controlli WM. Questi risultati indicano che la massa mitocondriale del muscolo scheletrico, ed in particolare la massa dei mitocondri SS, è ridotta alla fine della settimana di restrizione calorica.

In *figura 21* è riportata l'attività specifica dell'aconitasi, espressa in mU/mg di proteine, e della superossido dismutasi, espressa in U/mg di proteine. Per entrambe le frazioni mitocondriali si osserva una significativa diminuzione dell'attività specifica dell'aconitasi nei ratti RF rispetto ai ratti di controllo WM. Mentre si osserva un incremento significativo dell'attività specifica della SOD solo per i mitocondri SS dei ratti RF rispetto ai controlli WM.

La caratterizzazione metabolica dei ratti RF rispetto ai ratti di controllo WM è stata ottenuta dalla misura dei livelli plasmatici di NEFA, insulina e glucosio. Tali risultati, riportati nella *tabella 10*, mostrano che non c'è alcuna variazione dei livelli plasmatici di NEFA e di insulina nei ratti RF rispetto ai ratti di controllo WM, mentre si osserva un aumento significativo sia per i livelli di glucosio e che per l'indice HOMA, nei ratti RF rispetto ai ratti di controllo WM.



**Tabella 2**

**Peso corporeo, contenuto lipidico e proteico di ratti sottoposti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

	<b>WM</b>	<b>FR</b>
<b>Peso corporeo, g</b>	222,2±2,8	222,5±2,1
<b>Contenuto lipidico, g</b>	18,2±1,3	8,7±1,1*
<b>Contenuto proteico, g</b>	45,7±1,8	47,0±1,2
<b>Spesa energetica netta, kJ</b>	2723±136	1817±79*

I valori sono le medie ± ES di otto differenti esperimenti.

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM

**Tabella 3**

**Misura della respirazione in presenza di glutammato, succinato e palmitoil-CoA in mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

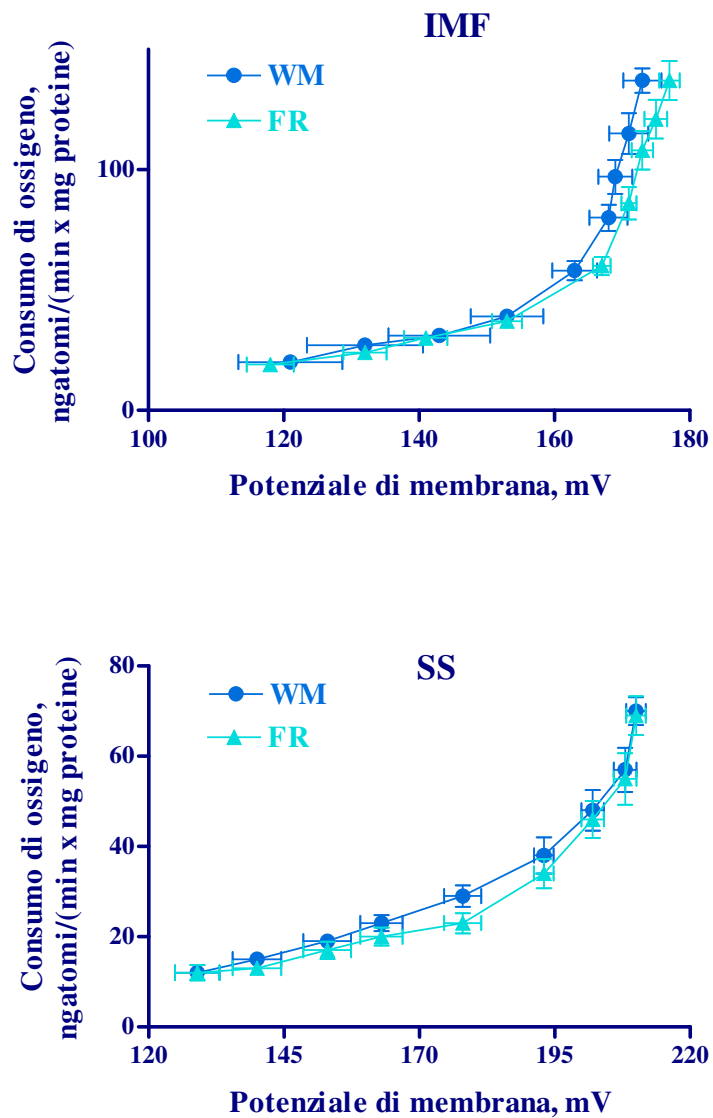
	IMF		SS	
	WM	FR	WM	FR
<b>Glutammato</b>				
Stato 3	750±50	746±30	341±20	256±21*
Stato 4	47,4±2,6	46,0±1,3	33,8±3,2	36,8±2,3
RCR	16,0±1,1	16,2±0,6	10,3±0,7	9,6±0,1
<b>Succinato</b>				
Stato 3	791±29	757±16	388±9	338±13*
Stato 4	181±6	169±6	76,1±2,1	77,3±2,3
RCR	4,4±0,1	4,5±0,1	5,1±0,2	4,4±0,1*
<b>Palmitoil-CoA</b>				
Stato 3	339±11	358±22	141±4	132±7
Stato 4	33,5±0,6	36,6±1,2	29,8±1,4	25,4±2,1
RCR	10,1±0,3	9,8±0,6	4,7±0,2	5,3±0,7

I valori sono le medie ± ES di otto differenti esperimenti.

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM.

**Figura 10**

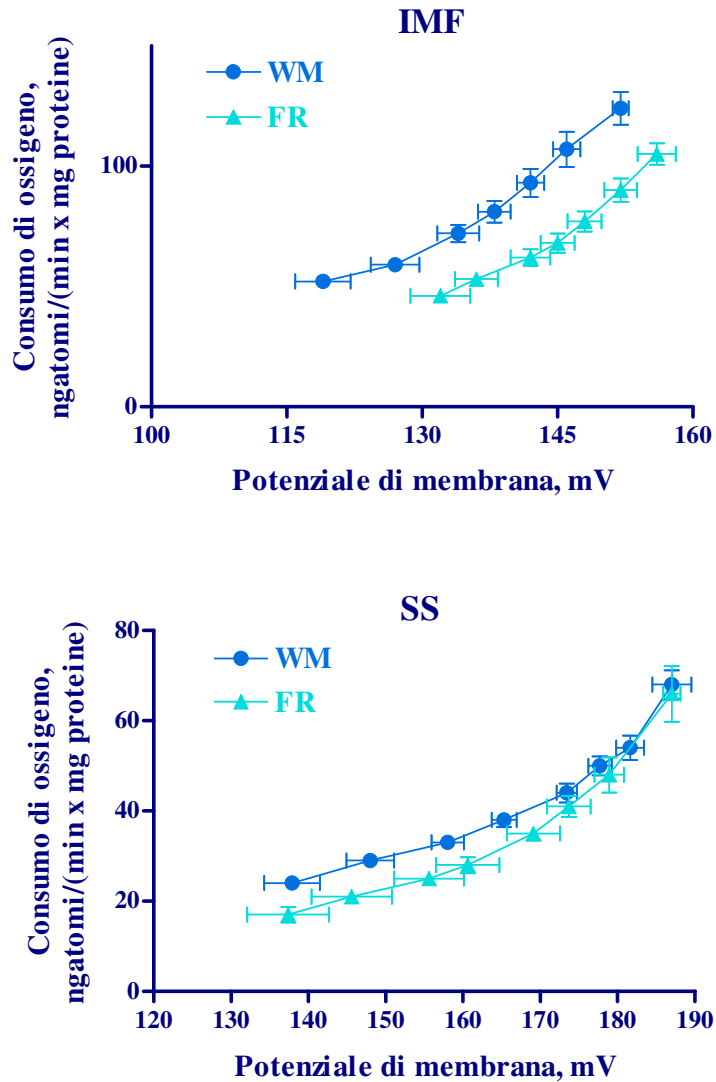
**Cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**



Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  ES di otto differenti esperimenti.

**Figura 11**

**Cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**



Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  ES di otto differenti esperimenti.

**Tabella 4**

**Effetto inibitorio della CAT, del glutammato e della BSA sulla diminuzione del potenziale di membrana indotta dal palmitato nei mitocondri intermiofibrillari (IMF) e subsarcolemmatici (SS) isolati dal muscolo scheletrico di ratti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

% della diminuzione del potenziale di membrana indotta dal palmitato abolita da:		WM	FR
<b>IMF</b>	<b>CAT</b>	77±3	100±3*
	<b>Glutammato</b>	12±1	0±0*
	<b>BSA</b>	11±3	0±0*
<b>SS</b>	<b>CAT</b>	50±4	100±0*
	<b>Glutammato</b>	34±3	0±0*
	<b>BSA</b>	16±1	0±0*

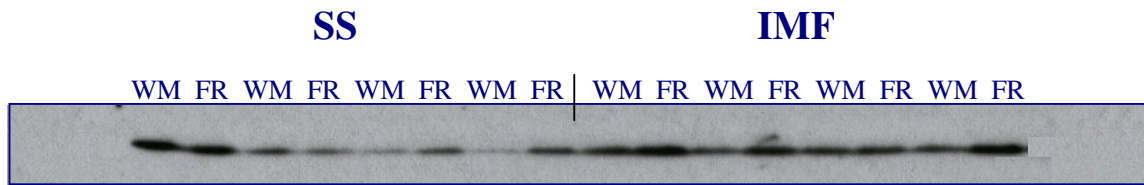
I valori sono le medie ± ES di otto differenti esperimenti.

CAT: carbossiatrattiloside.

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM.

## Figura 12

Misura del contenuto della proteina UCP3 nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)



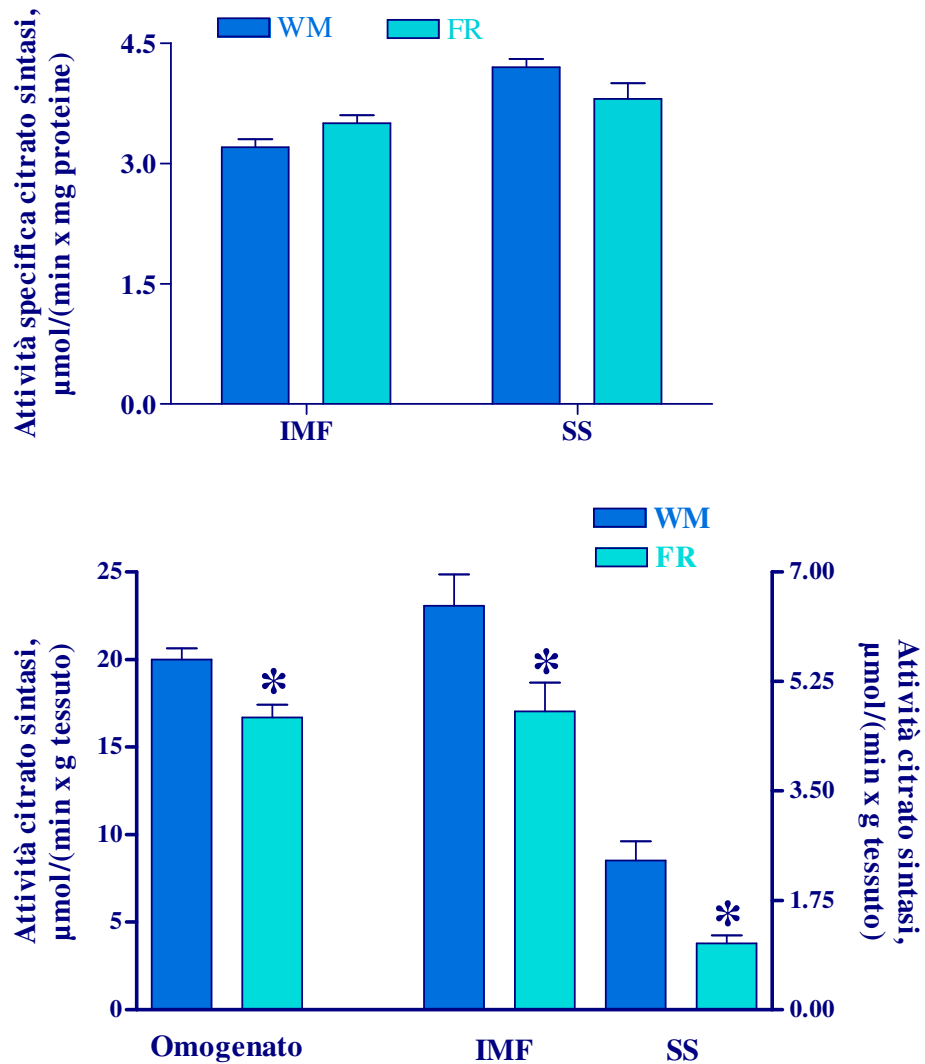
Livelli relativi della proteina UCP3

	<i>FR</i>	<b>WM</b>
<b>SS</b>	49±5	45±6
<b>IMF</b>	64±3	59±2

I valori sono le medie ± ES di otto differenti campioni e sono espressi in unità arbitrarie/mg di proteine.

**Figura 13**

Attività della citrato sintasi nell'omogenato e nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)

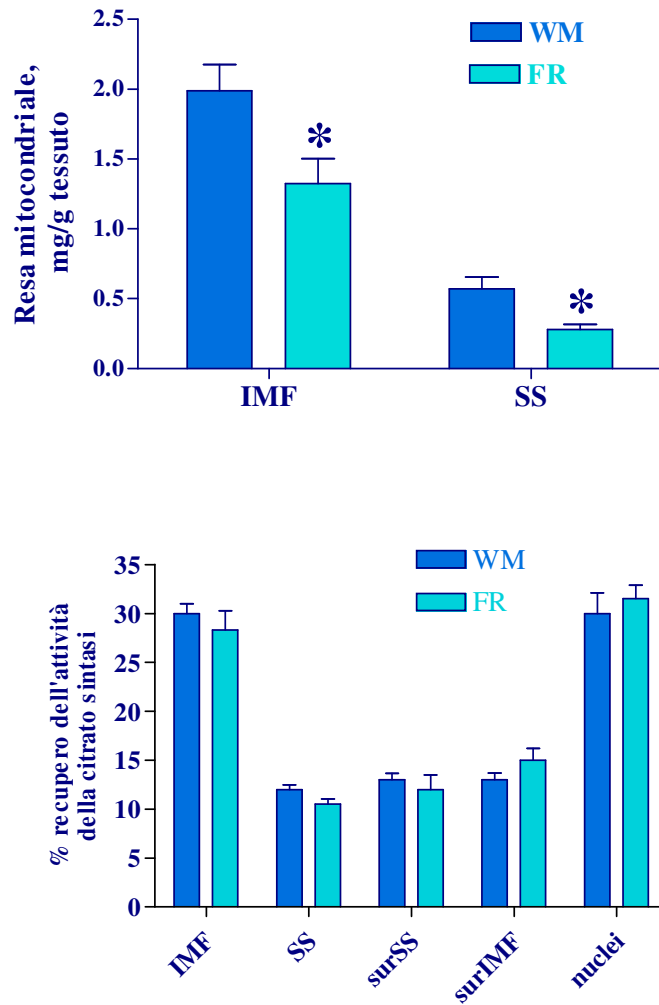


I valori sono le medie  $\pm$  ES di otto differenti esperimenti.

\*  $P < 0,05$  rispetto ai controlli WM.

**Figura 14**

**Resa proteica mitocondriale e percentuale di recupero dell'attività della citrato sintasi nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**



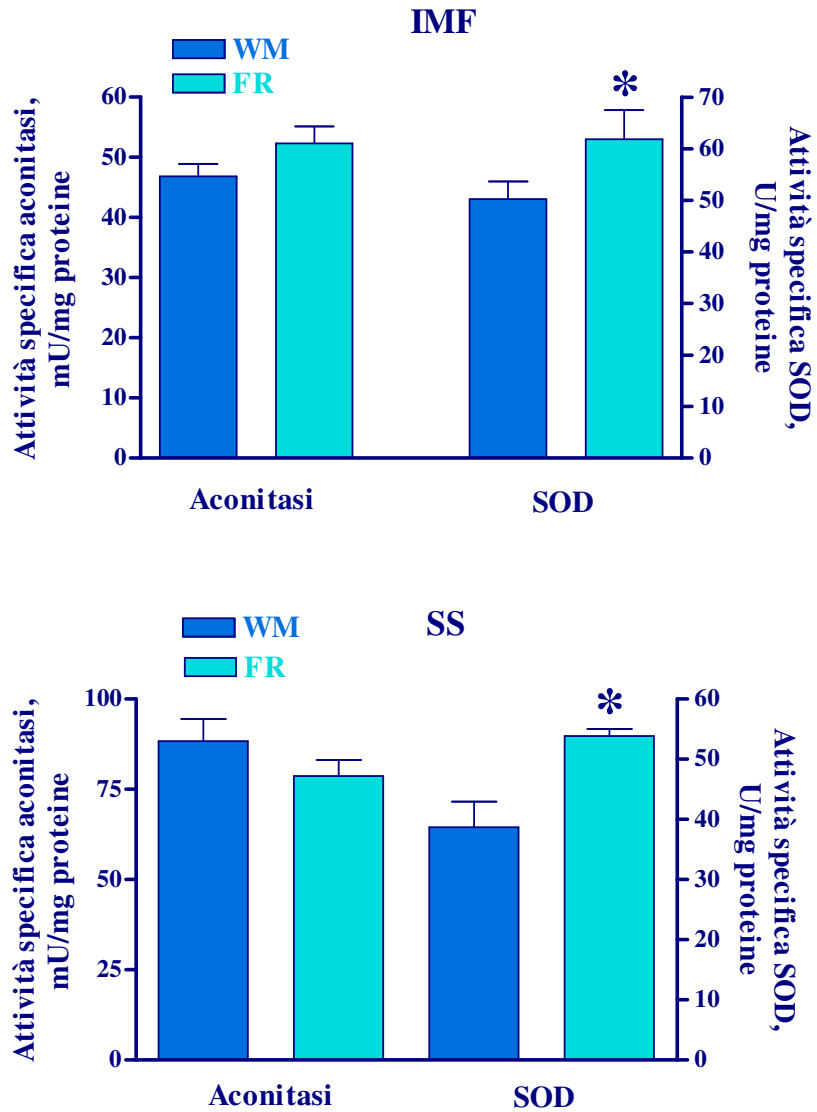
I valori sono le medie  $\pm$  ES di otto differenti esperimenti.

\*  $P < 0,05$  rispetto ai controlli WM.



**Figura 15**

**Attività dell'aconitasi e della SOD in mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**



I valori sono le medie  $\pm$  ES di otto differenti esperimenti.

SOD: superossido dismutasi.

\*  $P < 0,05$  rispetto ai controlli WM.

## Tabella 5

**Livelli plasmatici di substrati e ormoni di ratti sottoposti a restrizione calorica (FR) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

	<b>WM</b>	<b>FR</b>
<b>Insulina (ng/mL)</b>	1,89±0,47	1,78±0,95
<b>Glucosio (mg/dL)</b>	228±12	174±15*
<b>Indice HOMA</b>	24,8±1,2	17,6±0,9*
<b>NEFA (mmol/L)</b>	0,107±0,012	0,061±0,012*

I valori sono le medie ± ES di otto differenti ratti.

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM.

indice HOMA: [Glucosio (mg/dL) x Insulina (mU/L)]/405.

NEFA: acidi grassi non-esterificati.

### **Tabella 6**

**Guadagno del peso corporeo, del contenuto lipidico e proteico di ratti sottoposti a rialimentazione (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

	<b>WM</b>	<b>RF</b>
<b>Guadagno di peso, g</b>	64±4	68±6
<b>Guadagno lipidico, g</b>	11,5±0,7	18,0±0,7*
<b>Guadagno proteico, g</b>	11,2±2,8	11,0±1,2

I valori sono le medie ± ES di otto differenti esperimenti

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM

### **Tabella 7**

**Bilancio energetico di ratti sottoposti a rialimentazione (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

	<b>WM</b>	<b>RF</b>
<b>Guadagno energetico (KJ)</b>	686±31	945±40*
<b>Energia metabolizzabile introdotta (KJ)</b>	2404±51	2288±47
<b>Spesa energetica (KJ)</b>	1718±86	1343±78*
<b>Spesa energetica netta (KJ)</b>	1244±152	781±85*
<b>Efficienza (%)</b>	29±3	41±3*
<b>Spesa energ. netta/En. metabolizzabile (%)</b>	51,7±2,9	34,1±2,5*

I valori sono le medie ± ES di otto differenti ratti.

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM

**Tabella 8**

**Misura della respirazione in presenza di glutammato, succinato e palmitoil-CoA in mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a rialimentazione (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

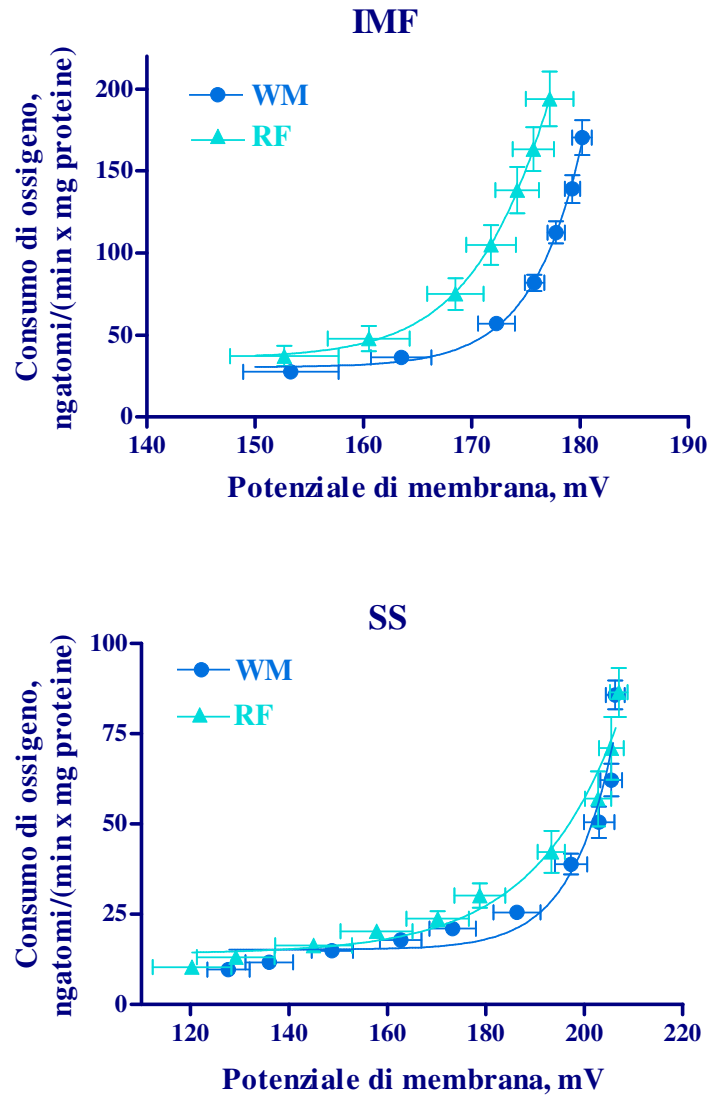
	IMF		SS	
	WM	RF	WM	RF
<b>Glutammato</b>				
Stato 3	877±19	883±45	357±21	263±21*
Stato 4	49,4±3,0	54,8±1,4	32,5±2,0	36,1±1,4
RCR	18,1±1,2	16,1±1,4	11,0±0,8	7,3±0,3*
<b>Succinato</b>				
Stato 3	857±22	982±22*	418±16	406±25
Stato 4	177±7	188±2	86,8±3,4	82,7±4,4
RCR	4,8±0,2	5,2±0,1	4,8±0,1	4,9±0,2
<b>Palmitoil-CoA</b>				
Stato 3	359±25	380±21	154±5	125±6*
Stato 4	39,2±1,8	42,3±3,0	26,5±0,9	28,6±3,2
RCR	9,1±0,3	9,0±0,6	5,8±0,4	4,6±0,2

I valori sono le medie ± ES di otto differenti esperimenti.

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM.

**Figura 16**

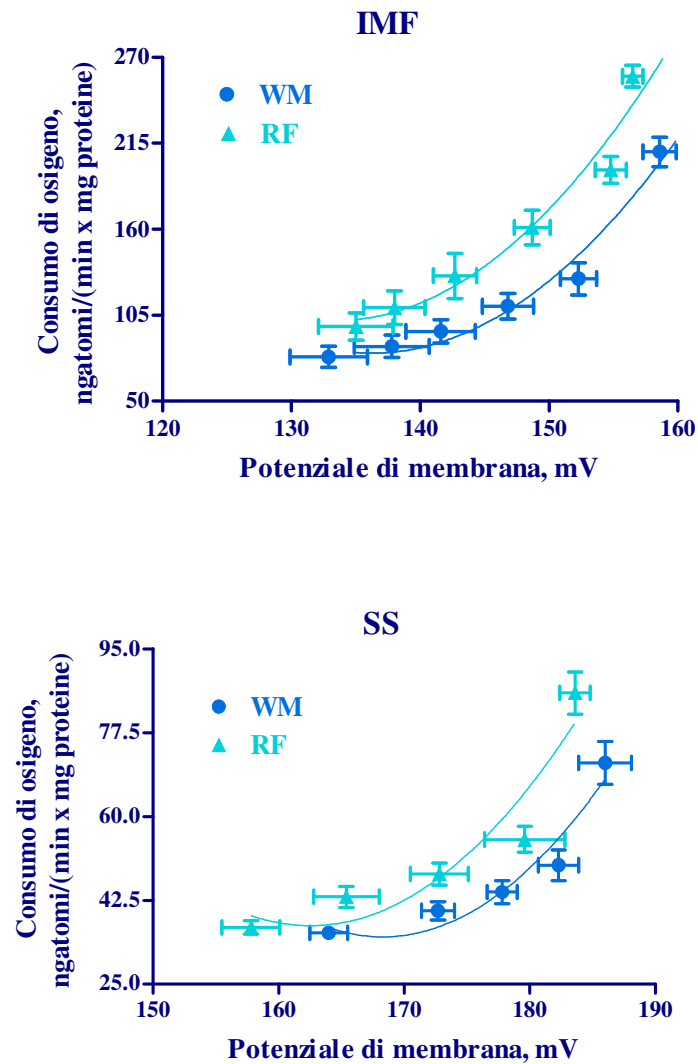
Cinetica della conduttanza protonica basale nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a rialimentazione (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)



Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  ES di otto differenti esperimenti.

**Figura 17**

**Cinetica della conduttanza protonica indotta dagli acidi grassi nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a rialimentazione (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**



Ogni punto rappresenta la media  $\pm$  ES di otto differenti esperimenti.

**Tabella 9**

**Effetto inibitorio della CAT, del glutammato e della BSA sulla diminuzione del potenziale di membrana indotta dal palmitato nei mitocondri intermiofibrillari (IMF) e subsarcolemmatici (SS) isolati dal muscolo scheletrico di ratti rialimentati (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

% della diminuzione del potenziale di membrana indotta dal palmitato abolita da:		WM	RF
<b>IMF</b>	<b>CAT</b>	72±10	56±5
	<b>Glutammato</b>	6±6	12±7
	<b>BSA</b>	0±0	0±0
<b>SS</b>	<b>CAT</b>	40±11	27±10
	<b>Glutammato</b>	13±9	14±9
	<b>BSA</b>	0±0	0±0

I valori sono le medie ± ES di otto differenti esperimenti.

CAT: carbossiatrattiloside.

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM.



### Figura 18

Misura del contenuto della proteina UCP3 nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a rialimentazione (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)

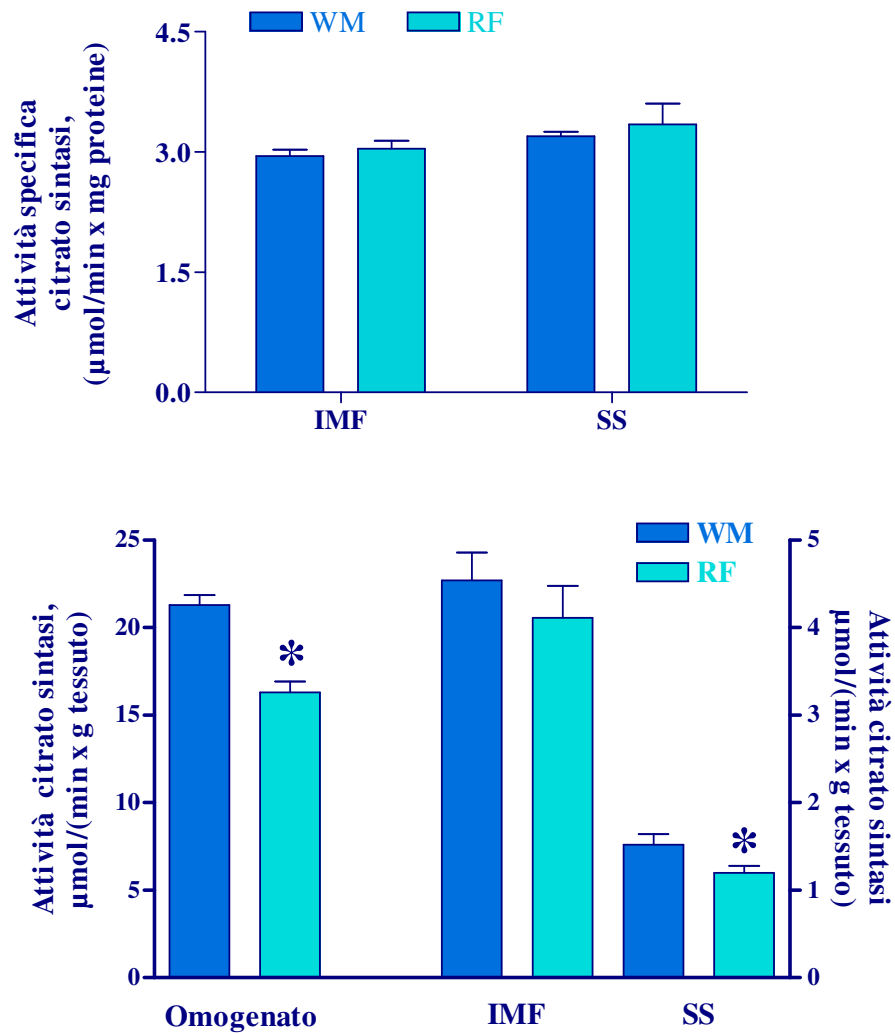
Livelli relativi della proteina UCP3

	<i>RF</i>	WM
SS	23±9	37±4
IMF	68±3	58±3

I valori sono le medie ± ES di otto differenti campioni e sono espressi in unità arbitrarie/mg di proteine.

**Figura 19**

**Attività della citrato sintasi nell'omogenato e nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a rialimentazione (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

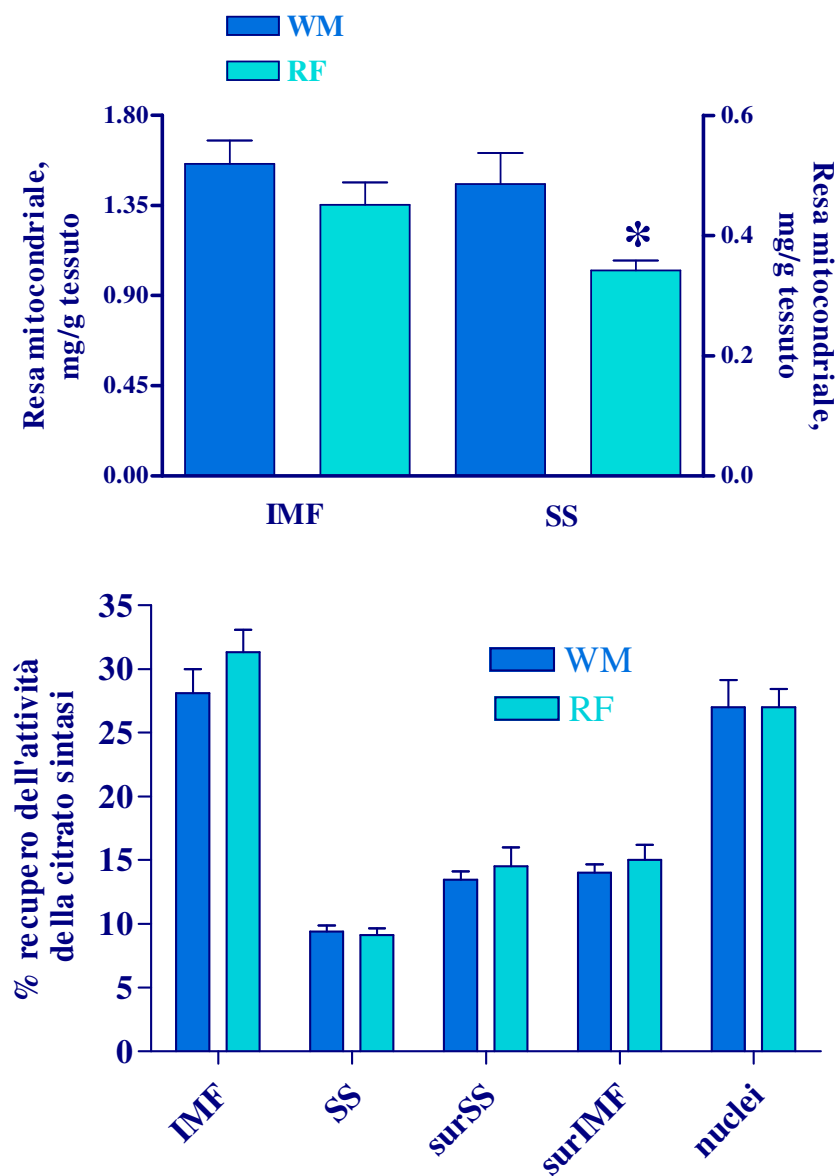


I valori sono le medie  $\pm$  ES di otto differenti esperimenti.

\*  $P < 0,05$  rispetto ai controlli WM.

**Figura 20**

**Resa proteica mitocondriale e percentuale di recupero dell'attività della citrato sintasi nei mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di rattisottoposti a rialimentazione (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

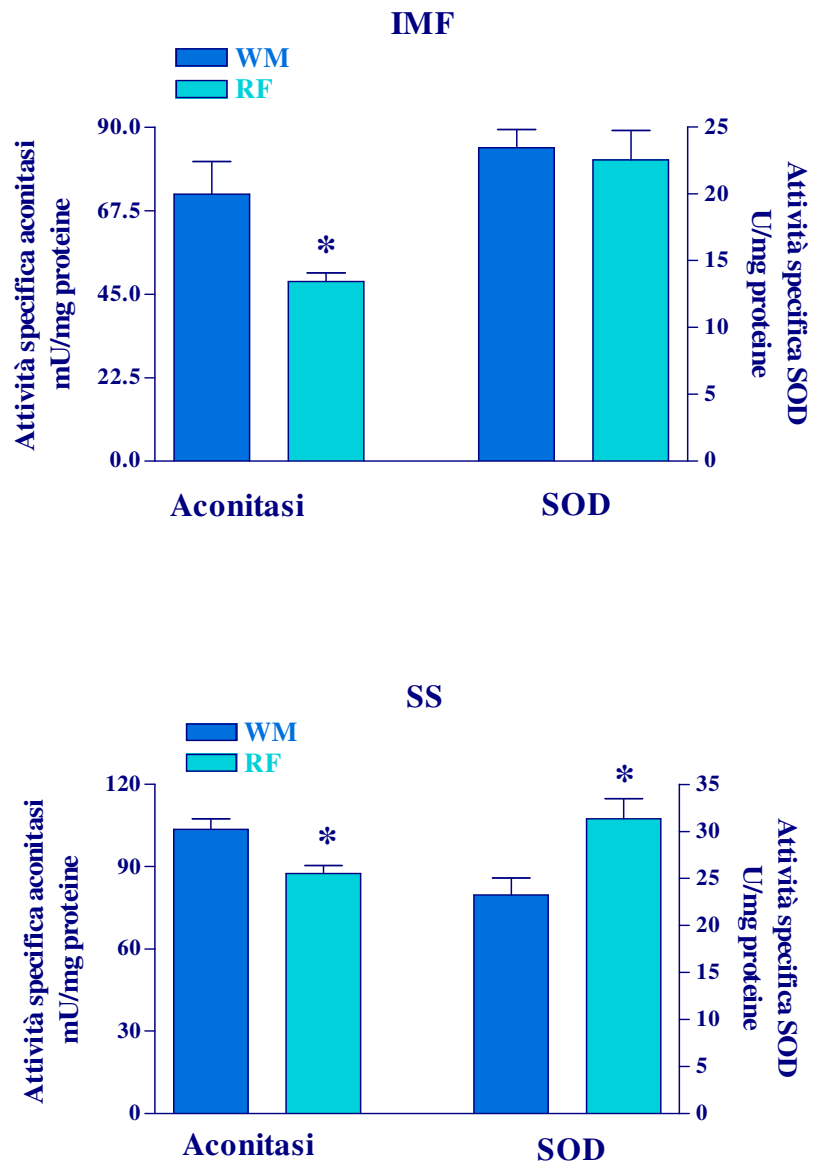


I valori sono le medie  $\pm$  ES di otto differenti esperimenti.

\*  $P < 0,05$  rispetto ai controlli WM.

**Figura 21**

**Attività dell'aconitasi e della SOD in mitocondri subsarcolemmatici (SS) ed intermiofibrillari (IMF) isolati dal muscolo scheletrico di ratti sottoposti a rialimentazione (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**



I valori sono le medie  $\pm$  ES di otto differenti esperimenti.

SOD: superossido dismutasi.

\*  $P < 0,05$  rispetto ai controlli WM.

**Tabella 10**

**Livelli plasmatici di substrati e ormoni di ratti sottoposti a rialimentazione (RF) e dei relativi controlli dello stesso peso (WM)**

	<b>WM</b>	<b>RF</b>
<b>Insulina (ng/mL)</b>	2,48±0,40	2,45±0,47
<b>Glucosio (mg/dL)</b>	178±6	202±6*
<b>Indice HOMA</b>	25,30±1,3	29,60±1,1*
<b>NEFA (mmol/L)</b>	0,102±0,012	0,091±0,011

I valori sono le medie ± ES di otto differenti ratti.

\* P<0,05 rispetto ai controlli WM.

indice HOMA: [Glucosio (mg/dL) x Insulina (mU/L)]/405.

NEFA: acidi grassi non-esterificati.

# **DISCUSSIONE**

La problematica preminente che è stata affrontata nel corso della mia tesi sperimentale ha riguardato lo studio delle caratteristiche funzionali (attività ed efficienza energetica) e strutturali (massa proteica) delle due popolazioni mitocondriali del tessuto scheletrico, che si suppone sia un sito di ridotta termogenesi, in relazione a situazioni di diminuita spesa energetica, come, la restrizione calorica e la rialimentazione, dopo un semidigiuno di due settimane.

Un periodo di restrizione calorica può simulare una delle frequenti diete ipocaloriche cui molte persone si sottopongono al giorno d'oggi in maniera saltuaria, causando quello che viene definito “effetto yo-yo”, ovvero un andamento altalenante del peso corporeo. In queste condizioni fisiologiche, avvengono delle alterazioni a carico dell'organismo, che rendono possibile compensare un ridotto apporto energetico, consentendo la sopravvivenza.

In particolare, il ridotto introito calorico porta ad una sensibile riduzione della spesa energetica, che non può essere spiegata solo con la perdita di massa metabolicamente attiva, ma che invece è anche dovuta ad un aumento dell'efficienza metabolica dell'organismo. Tale aumento permette, quindi, all'organismo di ricavare più ATP dall'ossidazione dei substrati energetici, in modo da ridurre l'utilizzo delle riserve corporee nel corso della restrizione calorica, e consente una più rapida ricostituzione di tali riserve nel corso della rialimentazione successiva alla restrizione. E'

stato, quindi, ipotizzato uno stato di ridotta termogenesi anche nella fase di rialimentazione dovuta allo stato di deplezione del tessuto adiposo, che permette una rapida ricostituzione delle riserve di energia corporee. Tale meccanismo di conservazione dell'energia evolutosi per ottimizzare la capacità di sopravvivenza in uno stile di vita caratterizzato da frequenti periodi di scarsità di cibo, contribuendo al rapido riacquisto del peso perduto dopo una dieta dimagrante, rappresenta un fallimento della restrizione calorica nel trattamento dell'obesità.

Una prova diretta dell'esistenza e del ruolo funzionale di un controllo adiposo specifico della termogenesi durante la restrizione e la successiva rialimentazione può essere ottenuta dal modello sperimentale utilizzato, dove i cambiamenti della spesa energetica e della composizione corporea (grasso e proteine), durante il recupero di peso corporeo che fa seguito ad un periodo di restrizione calorica, sono stati esaminati nella particolare condizione in cui il gruppo di ratti rialimentato (RF) introduce la stessa quantità di cibo del gruppo di controllo dello stesso peso (WM). Il livello di restrizione calorica è tale da mantenere il peso e le proteine corporee pressoché costanti durante le due settimane di trattamento, mentre il grasso corporeo si riduce di circa il 50% rispetto a prima della restrizione. Nella condizione in cui i ratti vengono rialimentati con la stessa quantità di cibo dei controlli WM, la velocità di deposito delle proteine risulta essere la



stessa dei controlli WM, mentre i lipidi sono immagazzinati a una velocità 2-3 volte più alta nei ratti RF rispetto ai controlli WM. La spiegazione più plausibile di tale risultato risiede nel fatto che, nonostante i due gruppi abbiano introdotto la stessa quantità di cibo, la spesa energetica è mantenuta ad un livello inferiore rispetto ai controlli anche nella fase di rialimentazione, e non solo durante la restrizione. Inoltre, questa aumentata efficienza metabolica è finalizzata specificamente ad accelerare il deposito dei lipidi e non quello delle proteine. L'aver rialimentato i ratti tenuti a restrizione con una quantità uguale di cibo dei ratti di controlli, alimentati ad libitum, è molto importante, in quanto consente di superare i problemi associati al confronto tra animali con differenze nelle dimensioni corporee, nell'introito calorico e nella velocità di deposito delle proteine. Ciò permette di determinare quanto contribuisce la riduzione adattativa della termogenesi alla diminuita spesa energetica, durante il recupero di peso. Di conseguenza la ridotta spesa energetica osservata nei ratti RF rispetto ai controlli WM rappresenta essenzialmente l'energia risparmiata come risultato della soppressione sostenuta della termogenesi, anche al termine della restrizione. Il fatto che questo fenomeno di conservazione dell'energia sia interamente finalizzato al ripristino delle riserve lipidiche, come mostrato dall'elevata velocità di accumulo di grasso, confermerebbe l'ipotesi dell'esistenza di un controllo della termogenesi adiposo-specifico,

il cui ruolo funzionale durante la fase di recupero del peso sia quello di ripristinare rapidamente le riserve lipidiche corporee.

Le ragioni dell'instaurarsi di tale meccanismo sono facilmente intuibili se lo si analizza da un punto di vista evolutivo; infatti, i mammiferi hanno dovuto far fronte all'alternanza tra periodi in cui il cibo scarseggiava, o vi erano specifiche carenze nutrizionali, e periodi più rari in cui vi era abbondanza di cibo. Poiché più del 90% dell'energia richiesta per la funzione cellulare è prodotta nei mitocondri durante la fosforilazione ossidativa, i cambiamenti nella massa proteica mitocondriale e/o nella capacità ossidativa potrebbero riflettersi sull'efficienza e sul metabolismo cellulare.

Per valutare i potenziali cambiamenti nella massa proteica mitocondriale in risposta alla restrizione calorica e alla rialimentazione, sono state effettuate misure dell'attività di un enzima marker mitocondriale, la citrato sintasi, sia nell'omogenato sia nelle due popolazioni mitocondriali del muscolo scheletrico: i mitocondri IMF e SS. E' stata inoltre valutata la resa mitocondriale per entrambe le sottopopolazioni mitocondriali.

I risultati ottenuti hanno mostrato che la massa proteica mitocondriale è significativamente ridotta per entrambe le popolazioni mitocondriali alla fine della restrizione calorica, e tale riduzione risulta essere più pronunciata nei mitocondri SS. Inoltre, dopo una settimana di rialimentazione la massa

proteica mitocondriale è significativamente diminuita solo nei mitocondri SS.

La specificità dei cambiamenti nel compartimento mitocondriale SS, soprattutto durante la rialimentazione, è evidenziata anche dall'analisi dell'attività respiratoria. Infatti, i risultati ottenuti indicano una diminuzione dello Stato 3 della respirazione in presenza sia di un substrato NAD dipendente (glutammato), sia in presenza di un substrato lipidico (Palmitoil CoA), solo nei mitocondri SS dei ratti rialimentati. Tali risultati indicano, quindi, che solo nei mitocondri SS vi è una continuità nella diminuzione della massa mitocondriale e della capacità ossidativa tra la restrizione calorica e la successiva rialimentazione. Tali cambiamenti quantitativi e qualitativi nel compartimento dei mitocondri SS potrebbero contribuire alla soppressione della termogenesi e favorire il recupero di grasso durante la rialimentazione, dopo la restrizione calorica.

Vari studi hanno suggerito che durante il recupero di peso, la condizione di soppressa termogenesi può avere un impatto diretto sulla resistenza all'insulina del muscolo scheletrico [Crescenzo R et al, 2003]. Il fatto che dopo una settimana di rialimentazione, l'indice HOMA (indicatore di resistenza all'insulina), ma non i NEFA plasmatici, risulta essere più alto nei ratti RF rispetto ai controlli WM, suggerisce che lo stato di resistenza all'insulina durante la rialimentazione precede lo sviluppo di un eccesso di

adiposità o di elevati NEFA plasmatici. In conseguenza di ciò le alterazioni a carico dei mitocondri SS durante la rialimentazione potrebbero avere un importante ruolo nella patogenesi della resistenza all'insulina durante il recupero di grasso, poiché questa popolazione mitocondriale sembra fornire l'energia ai processi che avvengono a livello della membrana cellulare, come la traduzione del segnale, lo scambio ionico, il trasporto dei substrati e l'attivazione dei substrati [Hood D, 2001], funzioni rilevanti per l'azione dell'insulina; mentre i mitocondri IMF supportano direttamente la contrazione muscolare. In realtà, un ruolo per la ridotta attività dei mitocondri SS nella patogenesi della resistenza all'insulina del muscolo scheletrico, nell'obesità e nel diabete di tipo 2 è stata recentemente avanzata sulle basi di evidenze che suggeriscono meno mitocondri SS e una più bassa attività della catena di trasporto degli elettroni nei mitocondri SS del muscolo scheletrico nei pazienti obesi o diabetici rispetto ai muscoli scheletrici dei volontari magri non diabetici [Ritov VB et al, 2005].

A causa, quindi, della potenziale importanza dei mitocondri SS per il supporto bioenergetico del segnale dell'insulina e il trasporto del glucosio mediato dall'insulina nel muscolo scheletrico, sorge la possibilità che la diminuzione sia della massa proteica mitocondriale sia dell'attività ossidativa nei mitocondri SS durante la rialimentazione, possa giocare un

ruolo nel meccanismo con cui la soppressa termogenesi nel muscolo scheletrico porta alla resistenza all'insulina durante il recupero di grasso.

Per avere maggiori informazioni sulle caratteristiche strutturali e funzionali è stata misurata la conduttanza protonica basale e indotta dagli acidi grassi (usando il palmitato come substrato). La variazione osservata nella conduttanza protonica è, però, nella direzione opposta a quella attesa sulla base della soppressa termogenesi. Infatti, la conduttanza protonica basale e la conduttanza protonica indotta dal palmitato non sono diminuite, ma aumentate in entrambi i mitocondri SS e IMF di ratti RF rispetto ai relativi controlli WM.

Inoltre sono andata a valutare il possibile coinvolgimento della proteina UCP3 in questa situazione di incrementato accoppiamento mitocondriale. I risultati da me ottenuti non hanno mostrato alcuna variazione nell'espressione di tale proteina, in ciascuna delle due frazioni mitocondriali del muscolo scheletrico, in seguito alla restrizione calorica e alla rialimentazione.

I presenti dati sono invece riconducibili ad un possibile coinvolgimento della conduttanza protonica sul controllo dei ROS mitocondriali. Infatti, uno dei ruoli fisiologici del parziale disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa è quello di limitare la produzione dei radicali liberi da parte della catena respiratoria mitocondriale [Korshunov SS et al, 1997].

I ROS sono principalmente prodotti durante lo stato di riposo della catena respiratoria (Stato 4: nessuna produzione di ATP), in particolare quando il gradiente protonico  $\Delta\mu H^+$  è elevato [Korshunov SS et al, 1997]. Ne consegue una probabilità maggiore che gli elettroni reagiscano direttamente con l'ossigeno molecolare per formare superossido e il ROS relativo [Papa S e Skulachev VP, 1997]. Infatti, la produzione di ROS è minore quando il  $\Delta\mu H^+$  è basso (Stato 3), quindi è stato ipotizzato che un blando disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa durante lo Stato 4 della respirazione, dissipando il gradiente protonico, potrebbe prevenire l'accumulo di ROS all'interno dei mitocondri [Papa S e Skulachev VP, 1997].

Quindi un'importante implicazione fisiologica dell'elevata conduttanza protonica basale e/o conduttanza protonica indotta dal palmitato nei mitocondri SS e IMF del muscolo, durante la rialimentazione, potrebbe essere la riduzione della produzione dei ROS, che è particolarmente elevata quando il turnover energetico nel muscolo scheletrico è basso e la respirazione mitocondriale opera vicino alle condizioni dello Stato 4. Per tali ragioni, si è ritenuto opportuno verificare sia la capacità di produzione che di rimozione dei ROS nei mitocondri SS ed IMF dei ratti a restrizione calorica e dopo rialimentazione, misurando l'attività di due enzimi mitocondriali: l'aconitasi e la superossido dismutasi. L'attività dell'

aconitasi è estremamente sensibile all'aumento della concentrazione di ROS prodotti e per tale ragione la sua misura è considerata un indice del danno ossidativo mitocondriale [Gardner PR, 2002], mentre la superossido dismutasi (SOD) è uno dei sistemi utilizzati dai mitocondri per metabolizzare i ROS. I risultati ottenuti mostrano che, nei ratti FR, contrariamente a quanto atteso, la diminuzione della conduttanza protonica indotta nei mitocondri IMF non comporta un danno ossidativo, dal momento che l'attività dell'aconitasi misurata in tali condizioni è paragonabile a quella dei ratti di controllo WM. Invece, durante la rialimentazione, l'aumento della produzione dei ROS mitocondriali è confermato da una più bassa attività dell'aconitasi in entrambi i mitocondri SS e IMF. Inoltre il compartimento dei mitocondri SS mostra anche un aumento dell'attività della SOD, suggerendo quindi un aumento nella difesa antiossidante.

Sulla base dei risultati ottenuti, è possibile affermare che mentre la restrizione calorica è uno stato fisiologico in cui vengono attivate le difese antiossidanti nei mitocondri del muscolo scheletrico, poiché si osserva un aumento dell'attività della SOD e nessuna variazione dell'attività dell'aconitasi, la rialimentazione sembra essere uno stato fisiologico in cui si verifica, oltre che un recupero di grasso, un aumento della produzione dei ROS. Ciò è dimostrato dalla diminuzione dell'attività dell'aconitasi,

che si verifica nonostante l'aumento delle difese antiossidanti nei mitocondri SS. Non è ancora noto in che misura, un aumento dei livelli dei ROS nel muscolo scheletrico potrebbe essere la causa o la conseguenza dello stato di resistenza all'insulina, durante la rialimentazione. Comunque, l'integrazione dei dati di questa tesi e di altri studi [Crescenzo R et al, 2003; Cettour-Rose P et al, 2005], ottenuti sempre utilizzando ratti rialimentati che recuperano peso, sottolineano un potenziale collegamento tra la frazione mitocondriale SS con una ridotta funzionalità, i livelli alterati dei ROS mitocondriali e la resistenza all'insulina, nei ratti che mostrano un recupero di peso come risultato della termogenesi soppressa.

In conclusione, la diminuzione della massa mitocondriale del muscolo scheletrico e della capacità ossidativa, specialmente nei mitocondri SS, può contribuire all'elevata efficienza con la quale le riserve di grasso corporeo sono ripristinate dopo la restrizione calorica. Inoltre, dato l'importante ruolo che hanno i mitocondri SS per il supporto bioenergetico della trasduzione del segnale, del trasporto dei substrati ed anche per l'azione dell'insulina, la ridotta funzionalità di questo compartimento mitocondriale, che è alla base della soppressa termogenesi nel muscolo scheletrico durante la fase di rialimentazione, può spiegare alcuni stati patologici collegati con il recupero del peso, come l'obesità, il diabete, l'ipertensione e le malattie cardiovascolari.



# **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

- ❖ Brand MD: The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Bioch Biophys Acta* **1018**, pp 128-133 (1990)
- ❖ Brand MD, Chein LF, Ainscow EK, Rolfe DFS, Porter RK: The causes and function of mitochondrial proton leak. *Bioch Biophys Acta* **1187**, pp 132-139 (1994)
- ❖ Crescenzo R, Samec S, Antic V, Rohner-Jeanrenaud F, Seydoux J, Montani JT, Dulloo AG: A role for suppressed thermogenesis favoring catch-up fat in the pathophysiology of catch-up growth. *Diabetes* **52**, pp 1090-1097 (2003)
- ❖ Dulloo AG, Girardier L: Influence of diet composition on energy expenditure during recovery of body weight in the rat: implications for catch-up growth and obesity relapse. *Metabolism* **41**, pp 1336-1342 (1992)
- ❖ Dulloo AG, Girardier L: Adaptive role of energy expenditure in modulation body fat and protein depositing during catch-up growth after early undernutrition. *Am J Clin Nutr* **58**, pp 614-621 (1993)
- ❖ Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L: Dissociation of enhanced efficiency of fat deposition during weight recovery from sympathetic control of thermogenesis. *Am J Physiol* **269**, pp R365-369 (1995)

- ❖ Dulloo AG, Jacquet J: Adaptive reduction in basal metabolic rate in response to food deprivation in human: a role for feedback signal from the fat stores. *Am J Clin Nutr* **68**, pp 599-606 (1998)
- ❖ Dulloo AG, Jacquet J: An adipose-specific control of thermogenesis in body weight regulation. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25**, (Suppl 5) pp S22-S29 (2001)
- ❖ Flohè L, Ötting F: Superoxide dismutase assay. *Methods Enzimol* **105**, pp 93-104 (1984)
- ❖ Folch J, Lees M, Stanley GHS: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, pp 497-510 (1957)
- ❖ Gardner PR: Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzimol* **349**, pp 10 (2002)
- ❖ Hartree EF: Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* **48**, pp 422-427 (1972)
- ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Barletta A, Liverini G: Effect of long-term high-fat feeding on energy balance and liver oxidative activity in rats. *Br J Nutr* **84** (3), pp 377-385 (2000)
- ❖ Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Botta M, Samec S, Solinas G, Manieri D, Dulloo AG, Liverini G: Skeletal muscle

mitochondrial efficiency and uncoupling protein 3 in overeating rats with increased thermogenesis. *Pflugers Arch* **445** (3), pp 431-436 (2002)

- ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, Liverini G: Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats. *Br J Nutr* **90** (5), pp 953-960 (2003)
- ❖ Srere PA: Citrate synthase. *Meth Enzymol* **13**, pp 3-5 (1969)

## BIBLIOGRAFIA CITATA

- ❖ Ames BN, Shinenaga MK, Hagen TM. *Biochem Biophys Acta* **1271**, pp 165-170 (1995)
- ❖ Arsenijevic D, Girardier L, Seydoux J, Chang HR, Dulloo AG. *Am J Physiol* **272**, pp E908-E917 (1997)
- ❖ Ashwell M, Rothwell NJ, Stirling D, Stock MJ, Winter PD. *Proc Nutr Soc* **43**, pp 148A (1984)
- ❖ Ashworth A. *Nature* **223**, pp 407-409 (1969)
- ❖ Bizeau ME, Willis WT, Hazel JR. *J Appl Physiol* **85** (4), pp 1279-1284 (1998)
- ❖ Boss O, Samec S, Paolini-Giacobino A, Dossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP. *FEBS Letters* **408**, pp 39-42 (1997)
- ❖ Brand MD. *Bioch Biophys Acta* **1018**, pp 128-133 (1990)
- ❖ Brand MD, Chein LF, Ainscow EK, Rolfe DFS, Porter RK. *Bioch Biophys Acta* **1187**, pp 132-139 (1994)
- ❖ Brozek J, Chapman CB, Keys A *JAMA* **137**, pp 1569-1574 (1948)
- ❖ Cannon B, Nedergaard J. *Essays in Biochemistry* **20**, pp 110-164 (1985)

- ❖ Cettour-Rose P, Samec S, Russel AP, Summermatter S, Mainieri D, Carrillo-Theander C, Montani JP, Seydoux J, Rohner-Jeanrenaud F, Dulloo AG. *Diabetes* **54**, pp 751-756 (2005)
- ❖ Challoner DR. *Nature* **217**, pp 78-79 (1968)
- ❖ Ciafarani S, Germani D, Branca F. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **81**, pp F71-F73 (1999)
- ❖ Cogswell AM, Stevens RJ, Hood DA. *Am J Physiol* **264**, pp C383-C389 (1993)
- ❖ Crescenzo R, Samec S, Antic V, Rohner-Jeanrenaud F, Seydoux J, Montani JT, Dulloo AG. *Diabetes* **52**, pp 1090-1097 (2003)
- ❖ Crescenzo R, Lionetti L, Mollica MP, Ferraro M, D'Andrea E, Mainieri D, Dulloo AG, Liverini G, Iossa S. *Diabetes* **55** (8), pp 2286-93 (2006)
- ❖ Dedukhova VI, Mokova EN, Skulachev VP, Starkov AA, Arigoni-Martelli E, Bobyleva VA. *FEBS Letters* **295**, pp 51-54 (1991)
- ❖ Desantels M, Himms-Hagen J. *Can J Biochem* **57**, pp 968-980 (1979)
- ❖ Drapier JC, Hibbs JBJ. *Methods Enzimol* **269**, pp 26 (1996)
- ❖ Dulloo AG, Girardier L. *Am J Clin Nutr* **52**, pp 415-420 (1990)
- ❖ Dulloo AG, Girardier L. *Metabolism* **41**, pp 1336-1342 (1992)
- ❖ Dulloo AG, Girardier L. *Am J Clin Nutr* **58**, pp 614-621 (1993)

- ❖ Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L. *Am J Physiol* **269**, pp R365-369 (1995)
- ❖ Dulloo AG, Jacquet J. *Am J Clin Nutr* **68**, pp 599-606 (1998)
- ❖ Dulloo AG, Jacquet J. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25**, (Suppl 5) pp S22-S29 (2001)
- ❖ Dulloo AG. *Acta Physiol. Scand.* **184**, pp 295-307 (2005)
- ❖ Eriksson JC, Forsen T, Tuomilehto J, Winter PD, Osmond C, Barker DJP. *Br Med J* **318**, pp 427-431 (1999)
- ❖ Fleury C, Neverona M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH. *Nature Genetics* **15**, pp 269-273 (1997)
- ❖ Flint DH, Allen RM. *Chem Rev* **96**, pp 2315 (1993)
- ❖ Flohè L, Ötting F. *Methods Enzimol* **105**, pp 93-104 (1984)
- ❖ Folch J, Lees M, Stanley GHS. *J Biol Chem* **226**, pp 497-510 (1957)
- ❖ Foster DO, Frydman ML. *Can J Physiol Pharmac* **56**, pp 110-122 (1978)
- ❖ Fridovich I. *Annu Rev Biochem* **64**, pp 97 (1995)
- ❖ Freaque HC, Oppenheimer JH. *Annu Rev Nutr* **15**, pp 263-291 (1995)
- ❖ Gardner PR, Costantino G, Szabò C, Salzman AL. *J Biol Chem* **272**, pp 25071 (1997)
- ❖ Gardner PR. *Methods Enzimol* **349**, pp 10 (2002)

- ❖ Garlid KD, Orsz DE, Modriansky M, Vassanelli S, Jerek P. *Biol Chem* **271**, pp 2615-2620 (1996)
- ❖ Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA, Tartaglia LA. *Diabetes* **46**, pp 900-906 (1997)
- ❖ Gong DW, He Y, Karas M, Reitman M. *Journal of Biological Chemistry* **272**, pp 24129-24132 (1997)
- ❖ Gong DW, Monemdjou S, Gavriloova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Chou CJ, Everett C, Kozak LP, Li C, Deng C, Harper ME, Reitman M. *J Biol Chem* **275**, pp 16251-16257 (2000)
- ❖ Hamm P, Shekelle RB, Stamler J. *Am J Epidemiol* **129**, pp 312-318 (1989)
- ❖ Hansford RG. *Bioch Biophys Acta* **726**, pp 41-80 (1983)
- ❖ Harper JA, Dickinson K, Brand MD. *Obes Rev* **2**, pp 255-265 (2001)
- ❖ Hartree EF. *Anal Biochem* **10**, pp 422-427 (1967)
- ❖ Hatch GM, Vance DE, Wilton DC. *Biochem J* **293**, pp 143-150 (1993)
- ❖ Henry CJK, Rivers, Payne PR. *Eur J Clin Nutr* **42**, pp 543-549 (1988)
- ❖ Himms-Hagen J, Triandafillon J, Gwillam C. *Am J Physiol* **241**, pp E116-E127 (1981)
- ❖ Himms-Hagen J. *FASEB Journal* **4**, pp 2890-2898 (1990)



- ❖ Hood D. *J Appl Physiol* **90**, pp 1137-1157 (2001)
- ❖ Hulsmann WC, Elliot WB, Slater EC. *Biochim Biophys Acta* **39**, pp 267-276 (1960)
- ❖ Huxley RR, Shiell AW, Law CM. *J Hypertens* **18**, pp 815-831 (2000)
- ❖ Imlay JA, Fridovich I. *J Biol Chem* **266**, pp 6957 (1991)
- ❖ Iossa S, Liverini G, Barletta A. *J Endocr* **135**, pp 45-51 (1992)
- ❖ Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Samec S, Dulloo AG, Liverini G. *FEBS Lett* **505**, pp 53-56 (2001)
- ❖ Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Botta M, Samec S, Solinas G, Mainieri D, Dulloo AG, Liverini G. *Pflugers Arch (european Journal of Physiology)* **445**, pp 431-436 (2002)
- ❖ Jackson AA *Adv Exp Med Biol* **478**, pp 41-55 (2000)
- ❖ Jezek P, Engstova H, Zackova M, Vercesi AE, Costa ADT, Arruda P, Garlid KD. *Biochim Biophys Acta* **1365**, pp 319-327 (1998)
- ❖ Kim JM, Woldgiorgis G, Elson CE, Shargo E. *Mech Aging Dev* **46**, pp 263-277 (1988)
- ❖ Klaus S, Castella L, Bouillaud F, Ricquier D. *International Journal of Biochemistry* **23**, pp 791-801 (1991)
- ❖ Klingenberg M, Winkler E. *J Biol Chem* **269**, pp 2508-2515 (1994)
- ❖ Kopelmann PG *Clin Endocrinol Metab* **13**, pp 613-614 (1984)

- ❖ Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. *Febs Letters* **416**, pp 15-18 (1997)
- ❖ Krieger DA, Tade CA, McMillin-Wood J, Booth FW. *J Appl Physiol* **48**, pp 23-28 (1980)
- ❖ Laganriere S, Yu BP. *Gerontology* **39**, pp 7-18 (1993)
- ❖ Laloi M, Klain M, Riesmier JW, Muller-Rober B, Fleury C, Bouillaud F, Ricquier D. *Nature* **389**, pp 135-136 (1997)
- ❖ Landsberg L, Young JB. *New Engl J Med* **298**, pp 1295-1301 (1978)
- ❖ Landsberg L et al. *Am J Physiol* **247**, pp E181 (1984) a
- ❖ Landsberg L, Saville ME, Young JB. *Am J Physiol* **247**, pp E181-E189 (1984) b
- ❖ Landsberg L. *Q J Med* **61**, pp 1081-1090 (1986)
- ❖ Larkin S, Mull E, Miao W, Pittner R, Albrandt K, Moore C, Young A, Denaro M, Beaumont K. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **240**, pp 222-227 (1997)
- ❖ Lee IM, Paffenbarger RS *JAMA* **268**, pp 2045-2049 (1992)
- ❖ Lissner L, Bengtsson C, Lapidus L, Larsson B, Beengtsson B, Brownell K *Obesity in Europe 88 John Libbey : London*, pp 55-60 (1989)
- ❖ Longo VD, Viola KL, Klein WL, Finch CE. *J Neurochem* **75**, pp 1977-1985 (2000)

- ❖ Ma SWY, Foster DO. *Can J Physiol Pharmac* **64**, pp 1252-1258 (1986)
- ❖ Maklashina E, Brian AC, Ackrell. *Aging cell* **3**, pp 21-27 (2004)
- ❖ Mao W, Yu XX, Zhong A, Li W, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan G. *FEBS Letters* **443**, pp 326-330 (1999)
- ❖ Mecocci P, MacGarvery U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Fallace DC, Beal MF. *Ann Neurol* **34**, pp 609-616 (1993)
- ❖ Nedergaard J. *Eur J Biochem* **183**, pp 185-191 (1983)
- ❖ Nicholls DG. *Eur J Biochem* **50**, pp 305-315 (1974)
- ❖ Nicholls DG, Bernson V, Heaton G,. In: Effectors of thermogenesis, Girardier L, Seydoux J. (editors). Basel: Birkhauser Verlag, pp 89-93. (1978)
- ❖ Nicholls DG. *Biochim Biophys Acta* **549**, pp 1-29 (1979)
- ❖ Nicholls DG, Locke RM. *Physiol Rev* **64**, pp 1-64 (1984)
- ❖ Noor R, Mittal S, Iqbal J. *Med Sci Monit* **8 (9)**, pp RA 210-215 (2002)
- ❖ Ong KKL, Ahmed ML, Emmet PM, Preece MA, Dunger DB. *BMJ* **320**, pp 967 971 (2000)
- ❖ Papa S e Skulachev VP. *Mol Cell Biochem* **174** (1-2), pp 305-319 (1997)
- ❖ Pressman BC, Lardy HA. *Biochim Biophys Acta* **21**, pp 458-466 (1956)

- ❖ Polčic P, Šabovà L, Kolarov J. *FEBS Letters* **412**, pp 207-210 (1997)
- P Popkin BM, Richards MK, Monteiro CA *J Nutr* **126**, pp 3009-3016 (1996)
- ❖ Popkin BM, Richards MK, Monteiro CA *J Nutr* **126**, pp 3009-3016 (1996)
- ❖ Quant PA, Robin D, Robin P, Ferre P, Brand MD, Girard J. *Eur J Biochem* **195**, pp 449-454 (1991)
- ❖ Ramsey JJ, Harper ME, Weindruch R. *Free Rad. Biol. Med.* **29**, pp 946-968 (2000)
- ❖ Rich-Edwards JV, Stamfer MJ, Manson JE, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, Willet WC, Hennekens CH. *Br Med J* **315**, pp 396-400 (1997)
- ❖ Richter C, Park JW, Ames BN. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, pp 6465-6467 (1998)
- ❖ Ricquier D, Castella L, Bouillaud F. *FASEB Journal* **5**, pp 2237-2242 (1991)
- ❖ Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. *Diabetes* **54**, pp 8-14 (2005)
- ❖ Rolfe DFS, Brand MD. *Am J Physiol* **271**, pp C1380-C1389 (1996)
- ❖ Roseboom TJ, van der Meulen JHP, Ravelli ACJ, Osmond C, Barker DJP, Bleker OP. *Mol Cell Endocrinol* **185**, pp 93-98 (2001)

- ❖ Rothwell NJ, Stock MJ. *Nature* **281**, pp 31-35 (1979)
- ❖ Samec S, Assimacopoulos-Jeannet F, Giacobino JP, Seydoux J, Dulloo AG. *Int J Obes Relat Disord* **21**, (Suppl 2) ppS99 (1997)
- ❖ Schroeder DG, Martorell R, Flores R. *Am J Epidemiol* **149**, pp 177-185 (1999)
- ❖ Schönfeld P. *FEBS Letters* **264**, pp 246-248 (1990)
- ❖ Shinohara Y, Unani A, Teshima M, Nishida H, Van Dam K, Terada H. *Biochim Biophys Acta* **1228**, pp 229-234 (1995)
- ❖ Skulachev VP. *FEBS Lett* **294**, pp 158-162 (1991)
- ❖ Skulachev VP. *Biosci. Rep.* **17**, pp 347-366 (1997)
- ❖ Skulachev VP. *FEBS Lett* **423**, pp 275-280 (1998) a
- ❖ Skulachev VP. *Biochim Biophys Acta* **1363**, pp 100-124 (1998) b
- ❖ Skulachev VP. *FEBS Lett* **24640**, pp 1-3 (2001)
- ❖ Sjöström CD, Peltonen M, Sjöström L. *Obes Res* **9**, pp 188-195 (2001)
- ❖ Soboll S, Grundel S, Schwabe U, Scholz R. *Eur J Biochem* **141**, pp 231-236 (1984)
- ❖ Solanes G, Vidal-Puig A, Grujic D, Flier JS, Lowel BB. *Biochemical and Biophysical Research Communications Acta* **272**, pp 25433-25436 (1997)
- ❖ Srere PA. *Meth Enzymol* **13**, pp 3-5 (1969)
- ❖ Staniek K, Nohl H. *Bioch Biophys Acta.* **1460**, pp 268-275 (2000)

- ❖ Stapleton T *Lancet* **1**, pp 850-851 (1946)
- ❖ Stuart JA, Harper JA, Brindle KM, Brand MD. *Biochimic Biophys. Acta* **1413**, pp 50-54 (1999)
- ❖ Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Kennedy MC. *Bioch Molecular Biology* **275**, pp 14064-14069 (2000)
- ❖ Victora CG e Barros FC. *Int J Epidemiol* **30**, pp 217-220 (2001)
- ❖ Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowel BB. *Biochemical and Biophysical Research Communications. Acta* **235**, pp79-82 (1997)
- ❖ Vidal-Puig A, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szcsepanik A, Wade J, Mootha V, Corthright R, Muoio DM, Lowel BB. *J Biol Chem* **275**, pp 16258-16266 (2000)
- ❖ Wallace DC. *Scienze* **256**, pp 628-632 (1992)
- ❖ Wojtczak L. *J Bioenerg Biomembr* **8**, pp 293-311 (1976)
- ❖ Wojtczak L, Schönfeld P. *Biochim Biophys. Acta* **1183**, pp 41-57 (1993)
- ❖ Wrigglesworth JM; Sharpe MA, Cooper CE. *Biochem Soc Trans* **21**, pp781-784 (1993)
- ❖ Yajid F, Mercier JC, Mercier BM, Dubouchaud H, Prefault C. *J Appl Physiol* **84**, pp 479-485 (1998)
- ❖ Zborowski J, Wojtczak L. *Biochim Biophys. Acta* **70**, pp 596-598 (1963)